

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI

MEDICINA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

CICLO XXIII

**VALUTAZIONE CON METODICHE IMAGING DELLA DEPOSIZIONE
ECTOPICA DEL TESSUTO ADIPOSO E SUE IMPLICAZIONI
CLINICHE**

S.S.D. **MED/09**

Coordinatore: Prof. **ENZO BONORA**

Tutore: Prof. **MAURO ZAMBONI**

Dottorando: Dott. **ANDREA ROSSI**

SUMMARY.....	pag 3
RIASSUNTO.....	pag 5
INTRODUZIONE.....	pag 7
SCOPO DELLA TESI.....	pag 24
MATERIALI E METODI.....	pag 28
RISULTATI.....	pag 38
DISCUSSIONE.....	pag 44
CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....	pag 53
BIBLIOGRAFIA.....	pag 56

SUMMARY

In the last few decades there has been increasing focus on body fat distribution rather than on the degree of obesity. More recently great interest has been also focused on the ectopic fat deposition (i.e. deposition of triglycerides at the level of liver, muscle and pancreas). Weight loss improves metabolic complications of obesity through visceral fat reduction. However little is known about the effect of weight loss on various ectopic fat compartments and about the possible contribution of ectopic fat reduction on metabolic alterations of obese subjects.

The purpose of this study was to compare liver and pancreas fat infiltration in men and women and determine the relationship between body fat distribution, adipocytokines, inflammatory markers, daily energy intake, dietary fat and lipid content of liver and pancreas, before and after weight loss.

The study population underwent a weight-loss program designed to achieve a loss of 10% of initial weight. The caloric restriction was 500 kcal below the resting energy expenditure, as evaluated by indirect calorimetry.

The present analyses were performed on 38 subjects (18 men and 20 women) with mean age 49.1 ± 13.0 years and mean body mass index (BMI) 34.9 ± 4.21 Kg/m. 24 subjects (13 men and 11 women) reached a $>7\%$ of initial weight and were therefore evaluated at follow-up.

Weight, height, body mass index (BMI), waist circumference, fat mass and fat mass percentage as evaluated with DXA, as well as glucose, insulin, HOMA, cholesterol, triglycerides, HDL-Ch, Hs-CRP, daily energy and fat intake, leptin and adiponectin were evaluated before and after weight loss. Magnetic resonance was used to evaluate visceral, subcutaneous adipose tissue as well as liver and pancreas lipid content using in-phase and out-of-phase MRI sequence.

Obese subjects had significantly higher weight, waist circumference, SCAT, Deep SCAT, VAT, liver and pancreatic lipid content than lean subjects. Obese women had significantly lower VAT, liver and pancreas lipid content regardless same BMI. In multiple regression analyses, the variance of liver

lipid content explained by gender and VAT was 46%. When HOMA was added into a multiple regression a small increase in the proportion of variance explained was observed. A 59.2% of the variance of pancreas lipid content was explained by gender and VAT.

After a mean body weight decrease of 8.9 %, BMI, Waist circumference, total and FM %, as well as all metabolic variables, ALT, Hs-CRP and adipokines but adiponectin and HDL-Ch, significantly decreased (all $p < 0.01$). Visceral, subcutaneous and total abdominal adipose tissue significantly decreased ($p < 0.001$), as well as liver and pancreas lipid content ($p < 0.001$ and $p = 0.001$ respectively). After weight loss, percentage of subjects with steatosis decreased from 75% to 12.5% and none of the subjects had grade 2 or 3 of steatosis. Visceral adipose tissue decrease was the best predictor of the reduction in liver and pancreas lipid content observed with weight loss. The insulin resistance improvement observed after weight loss is mainly independently related with liver lipid content decrease, waist circumference and systemic inflammation reduction.

RIASSUNTO

Nelle ultime decadi si è assistito ad un aumento dell'interesse per la deposizione di grasso ectopico corporeo, come processo fisiopatologico implicato nelle alterazioni metaboliche dei soggetti obesi. In particolare la deposizione di grasso ectopico nel fegato sarebbe implicata nello sviluppo di insulino-resistenza e di progressivo danno epatico, prima metabolico e reversibile (NAFLD), poi infiammatorio e permanente (NASH). Nel pancreas si è osservato che l'infiltrazione lipidica è implicata nella disfunzione e nel danno alla massa β -cellulare.

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare il grado di infiltrazione lipidica di fegato e pancreas tra soggetti di sesso maschile e femminile e valutare la relazione tra infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas, e fenotipo di distribuzione regionale del tessuto adiposo, adipochine, marker infiammatori, introito calorico e lipidico quotidiano, prima e dopo calo ponderale. Tali soggetti sono quindi stati sottoposti ad intervento di 3-6 mesi di restrizione dietetica con riduzione calorica di 500 Kcal rispetto al dispendio energetico a riposo.

Sono stati inclusi nello studio alla valutazione basale 38 soggetti (18 uomini e 20 donne) con età media di 49.1 ± 13.0 anni e indice di massa corporea (BMI) di 34.9 ± 4.21 Kg/m², non diabetici. Dei soggetti arruolati al basale 24 soggetti (13 uomini e 11 donne) hanno raggiunto calo ponderale $>7\%$ del peso iniziale e sono stati quindi sottoposti a valutazione dopo calo di peso.

In tutti i soggetti sono state valutate: variabili antropometriche (peso, altezza, BMI, circonferenza vita), composizione corporea (massa grassa e massa magra) con Dual Energy X-ray Absorptiometry, variabili metaboliche (glicemia, insulinemia, trigliceridi, indice HOMA), leptina, adiponectina, hsPCR, abitudini alimentari (apporto giornaliero di grassi con la dieta, introito calorico quotidiano); e tramite RMN quantità di tessuto adiposo viscerale (VAT), sottocutaneo (SCAT) e contenuto lipidico di fegato e pancreas.

Dai risultati è emerso che le donne hanno minor grado di infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas rispetto agli uomini. Il tessuto adiposo viscerale è

risultato il principale predittore di deposizione di grasso ectopico sia nel fegato che nel pancreas.

E' stata inoltre osservata correlazione negativa tra adiponectina e deposizione di grasso ectopico sia nel fegato che nel pancreas.

Dopo calo ponderale medio dell' 8.9%, si è assistito a significativa diminuzione di BMI, circonferenza vita e percentuale di massa grassa, così come delle principali variabili metaboliche, ALT, leptina e hs-PCR. Si è osservato significativo decremento di tessuto adiposo viscerale addominale e tessuto adiposo addominale totale ($p < 0.001$) e del contenuto lipidico del fegato e del pancreas ($p = 0.001$). Dopo calo ponderale è stato osservato che la percentuale dei soggetti con steatosi epatica è diminuita dal 75% al 12.5% ($p = 0.008$). La riduzione del grasso viscerale osservata dopo calo di peso è risultata essere il migliore predittore del decremento del contenuto lipidico di fegato e pancreas. Il miglioramento dell'insulino-resistenza osservato dopo calo ponderale è risultato predetto in modo indipendente dalle variazioni del contenuto lipidico del fegato, della circonferenza vita e della PCR ad alta sensibilità.

INTRODUZIONE

Nelle ultime decadi si è assistito all'aumento del fenomeno dell'obesità, che ha colpito dapprima gli Stati Uniti e a seguire anche Europa ed Asia. Un recente studio indica che il 65% della popolazione adulta negli Stati Uniti è obesa o in sovrappeso [1].

In questi stessi anni, dati epidemiologici hanno messo in evidenza come la prevalenza di sindrome metabolica, insulino-resistenza e diabete sia cresciuta parallelamente all'aumento dell'obesità [2]. Numerosi studi inoltre hanno osservato una relazione tra obesità e steatosi epatica non alcolica (NAFLD) [3] ed anche tra obesità e infiltrazione lipidica del muscolo [4].

Per spiegare tali alterazioni metabolico-sistemiche grande attenzione è stata posta sulla diversa distribuzione del grasso corporeo [5], sulle differenti tipologie di grasso corporeo e sul loro ruolo [6], nonché sulla presenza di grasso ectopico all'interno di organi diversi dal tessuto adiposo e sulle conseguenze di quest'ultima su di essi [7].

Ruolo della distribuzione regionale del tessuto adiposo

A partire dagli anni '50 è stato proposto che l'eccesso di grasso accumulato a livello addominale o *obesità androide* o a distribuzione centrale è metabolicamente più dannoso di quello accumulato a livello gluteo (*obesità ginoide* o a distribuzione periferica) [8]. Tale ipotesi è stata confermata da numerosi studi, con il riconoscimento dell'*obesità addominale* come elemento cardine della sindrome metabolica [9].

Attualmente le nostre conoscenze sulle differenze di distribuzione del tessuto adiposo derivano in gran parte da studi clinici condotti con metodiche di imaging quali la Tomografia assiale computerizzata (TAC) e la Risonanza magnetica (RMN) [5]. Il tessuto adiposo bianco, dunque, può essere suddiviso in due parti principali: sottocutaneo (SCAT) e viscerale (VAT); il primo localizzato tra cute e fascia muscolare che riveste i muscoli della parete toracica, addominale e pelvica il secondo internamente ad essi [5]. Il tessuto adiposo sottocutaneo è inoltre ulteriormente suddiviso in due compartimenti

separati dalla fascia abdominis: tessuto adiposo sottocutaneo superficiale (SCAT superficiale) e tessuto adiposo sottocutaneo profondo (SCAT profondo) [10].

Di grande importanza sono i dati riguardanti le differenze metaboliche fra i soggetti con eccesso di tessuto adiposo nei diversi distretti regionali: a parità di peso corporeo, soggetti con eccesso di grasso viscerale presentano maggiore resistenza insulinica rispetto a coloro che presentano prevalente localizzazione sottocutanea dell'adipe [6]. In un recente studio Goodpaster et al. misurando grasso addominale viscerale e sottocutaneo con tomografia assiale computerizzata in più di 3000 soggetti in età avanzata, hanno osservato come il tessuto adiposo viscerale sia il più importante predittore dello sviluppo di sindrome metabolica nei soggetti normopeso, sovrappeso e obesi; al contrario il tessuto adiposo sottocutaneo è risultato associato alla sindrome metabolica solo nei soggetti con peso normale [11]. Kelley et al hanno inoltre evidenziato come il tessuto adiposo sottocutaneo profondo (SCAT profondo) sia fortemente associato all'insulino-resistenza, rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo superficiale (SCAT superficiale) [10].

Il tessuto adiposo viscerale è caratterizzato da maggiore attività lipolitica, con maggiore rilascio in circolo di acidi grassi liberi (FFA) rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo [12]. Differente è anche il drenaggio venoso. Il drenaggio, infatti, dal tessuto adiposo viscerale è diretto al circolo portale, mentre quello dal tessuto adiposo sottocutaneo è diretto al circolo sistemico. In tal modo i prodotti metabolici rilasciati dal grasso viscerale raggiungono il fegato come primo passaggio [13], anche se è stato osservato che nei soggetti con obesità viscerale più del 50-60% degli acidi grassi liberi che giungono al fegato provengono dal circolo sistemico [12]. L'esposizione dei tessuti epatici ed extraepatici ad elevate concentrazioni di FFA conduce ad alterazione nella dinamica dell'azione dell'insulina riducendone la clearance epatica [6].

Numerosi dati dimostrano inoltre la relazione tra eccesso ponderale e stato infiammatorio cronico, con una correlazione decisamente più forte tra tessuto adiposo viscerale e markers infiammatori rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo, come osservato nel Framingham Heart Study [14]. È stato

inoltre dimostrato che l'aumento dell'adiposità viscerale provoca maggior produzione di adipochine e peptidi pro infiammatori e pro trombotici rispetto al tessuto adiposo sottocutaneo [15].

Ruolo delle adipochine

Nelle alterazioni metaboliche correlate all'obesità gioca un ruolo fondamentale la produzione di adipochine, proteine biologicamente attive secrete sia dalla componente cellulare che da quella stromale del tessuto adiposo. Il tessuto adiposo, infatti, non svolge esclusivamente la funzione di omeostasi dei trigliceridi, ma agisce come vero e proprio organo endocrino, regolando in modo complesso il senso di sazietà, la termogenesi, l'immunità e la funzione neuroendocrina attraverso, appunto, la secrezione delle adipochine [16]. In aggiunta, l'adipocita rilascia anche acidi grassi, citochine, colesterolo, ormoni steroidei e prostaglandine [16]. Le adipochine agiscono sul tessuto adiposo stesso in modo autocrino e paracrino, ma anche in modo endocrino, su organi e tessuti bersaglio lontani come: ipotalamo, pancreas, fegato, muscolo scheletrico, rene, endotelio e sistema immunitario [17]. La produzione di molte adipochine risulta alterata nell'obesità ed è stato ipotizzato che tali alterazioni siano alla base della patogenesi di molte complicanze dell'obesità, tra cui le alterazioni del metabolismo glucidico. Alcune adipochine, come TNF- α , IL-6, leptina e adiponectina, infatti sono in grado di influenzare profondamente insulino-resistenza e metabolismo glucidico [17]. La leptina è stata la prima adipochina ad essere stata descritta ed è principalmente rilasciata in circolo dagli adipociti maturi in risposta ai cambiamenti della massa grassa corporea e allo stato nutrizionale [18]. A livello ipotalamico la leptina agisce in senso anoressizzante, provocando la riduzione dell'introito di cibo; agisce inoltre come ormone insulino-sensibilizzante nel miocita, nell'epatocita e nella cellula β -pancreatica, riducendo inoltre l'accumulo lipidico. Nel muscolo l'aumento della sensibilità insulinica avviene grazie all'inibizione della sintesi di malonil-CoA [19], con l'aumento del trasporto degli acidi grassi all'interno del mitocondrio. La leptina stimola direttamente l'adenosina monofosfato chinasi (AMPK), che

attiva le vie cataboliche che producono ATP, come la beta-ossidazione e la glicolisi e inibisce le vie anaboliche che consumano ATP [20]. La segnalazione leptinica utilizza la via JAK-STAT: il legame della leptina al proprio recettore provoca l'autofosforilazione di JAK1 e JAK2 e la fosforilazione e l'attivazione di STAT3, quest'ultimo sviluppa quindi una omodimerizzazione traslocando nel nucleo e provocando l'espressione di numerosi geni [16]. È stato dimostrato inoltre che l'attivazione del recettore della leptina regola IRS-1 e IRS-2, Akt e PI3 chinasi evidenziando un possibile collegamento tra leptina ed attività insulinica [21]. Nei soggetti obesi i livelli di leptina sono aumentati [22], e in tali pazienti è stata dimostrata la condizione di leptino-resistenza, la cui causa potrebbe essere la riduzione del trasporto della leptina attraverso la barriera emato-encefalica o la riduzione della segnalazione leptinica nell'ipotalamo [23]. Alcuni studi dimostrano inoltre come la leptino-resistenza sia correlata con la deposizione ectopica di lipidi, confermando che nei soggetti obesi l'azione antisteatosica della leptina è alterata [24].

L'adiponectina, in contrasto con le altre adipochine, è ridotta nei soggetti obesi e negli stati di insulino-resistenza [25]; alcuni studi eseguiti nei primati rivelano significativa relazione fra bassi livelli di adiponectina e sviluppo di sindrome metabolica [26]. Molteplici sono le azioni di questa adipochina: stimola l'ossidazione degli acidi grassi, blocca la gluconeogenesi epatica, inibisce l'adesione monocitaria, la trasformazione macrofagica e la proliferazione di cellule muscolari lisce nei vasi [25]. Queste azioni metaboliche e anti-infiammatorie sono strettamente associate con l'attivazione dell'AMP chinasi e con la modulazione dell'NF- κ B. I recettori dell'adiponectina sono due: Adipo R1 espresso a livello muscolare, Adipo R2 espresso principalmente a livello epatico; il primo media la propria azione attraverso l'attivazione di AMP chinasi, avendo come bersaglio l'acetyl CoA carboxilasi [27], il secondo attiva la via di trasduzione del PPAR- α nel fegato aumentando la sensibilità insulinica e riducendo l'infiammazione [28]. L'IL-6 e il TNF- α sono potenti inibitori dell'espressione dell'adiponectina [29].

È ormai riconosciuto come molte citochine infiammatorie siano prodotte e secrete dagli adipociti bianchi. L'obesità è infatti correlata con uno stato di infiammazione cronica e con l'aumento dei livelli circolanti di molti marker infiammatori. Altre cellule oltre agli adipociti maturi producono molecole implicate nel processo infiammatorio, in particolare i pre-adipociti e i macrofagi [30]. Diverse sono le ipotesi sull'origine di questo stato infiammatorio nei soggetti obesi ed in particolare tre sono le principali riconosciute: lo stress ossidativo [31], lo stress del reticolo endoplasmatico [32], e l'ipossia locale [33]. In quest'ultima si considera che l'espansione della massa del tessuto adiposo, provocata dall'aumento di volume degli adipociti, generi una distanza dalle strutture vascolari, provocando uno stato locale di ipossia [33]. Sarebbe tale condizione a iniziare la risposta infiammatoria, attraverso la via mediata da HIF-1 [30]. Molte osservazioni supportano il concetto del tessuto adiposo bianco ipossico nell'obesità: gli adipociti con diametro tra 150 e 200 μm presentano diametro maggiore della normale distanza di diffusione dell'ossigeno [34]; inoltre, sebbene i soggetti obesi abbiano, per definizione, un aumento del tessuto adiposo, la gittata cardiaca e il flusso di sangue totale che lo raggiunge non aumenta [35]. Alcuni studi hanno dimostrato come l'ipossia induca l'espressione di alcuni geni pro-infiammatori nei pre-adipociti e ne blocchi la differenziazione in adipociti maturi [30]; anche i macrofagi inoltre sono sensibili allo stato ipossico con la produzione di citochine pro-infiammatorie [36]. Quest'ultime dunque, come precedentemente detto, hanno un ruolo nelle alterazioni metaboliche presenti nell'obesità: la prima citochina ad essere scoperta è stato il TNF- α . Esso è sintetizzato dagli adipociti viscerali, dalle cellule stromali e dai macrofagi attivati dall'endotossina [37] ed i suoi effetti sono mediati da due recettori TNF-R1 e TNF-R2. TNF-R1 media apoptosi e lipolisi, mentre TNF-R2 è implicato nell'induzione dell'insulino-resistenza. Il TNF- α agisce sia in modo autocrino/ paracrino che endocrino, con un ruolo importante nella genesi dell'insulino-resistenza: esso riduce infatti l'espressione di GLUT-4 e l'attività della lipoprotein lipasi (LPL) [37], altera il segnale insulinico attraverso la fosforilazione delle IRS da parte delle JNK [38], causa inoltre

L'attivazione di PPAR- γ e riduce la secrezione e l'espressione di leptina dagli adipociti. È stato stimato che circa il 33% dell'IL-6 circolante provenga dal tessuto adiposo, in particolare la maggior parte dalla componente stromale; nei soggetti obesi i livelli di questa citochina sono aumentati [39]. L'IL-6 ha molteplici effetti: con azione paracrina diminuisce la secrezione di adiponectina, inibisce la lipoprotein lipasi (LPL) sulle cellule endoteliali e attiva la lipolisi. Essa può inoltre raggiungere il fegato dal tessuto adiposo viscerale, attraverso la via portale, e mediare importanti effetti metabolici legandosi al proprio recettore sull'epatocita. È stato dimostrato la capacità dell'IL-6 di bloccare il segnale insulinico, attraverso la riduzione della fosforilazione in tirosina di IRS-1, la riduzione dell'associazione fra la subunità p85 della PI3 chinasi e IRS-1 e l'inibizione di Akt, importante mediatore delle azioni metaboliche dell'insulina [40]. L'IL-6 agisce inoltre inibendo la glicogeno sintasi e attivando la glicogeno fosforilasi, aumentando la lipolisi e l'immissione in circolo di acidi grassi liberi [41].

Nella condizione di obesità, quindi, lo stato di infiammazione cronica, e l'alterata secrezione delle adipochine, sono strettamente collegati alle conseguenze metaboliche ad essa associata.

Ruolo dell'alterazione del metabolismo degli acidi grassi liberi

Fisiologicamente i grassi introdotti con la dieta vengono assorbiti dalle cellule epiteliali intestinali e rilasciati in circolo sotto forma di chilomicroni; la lipoprotein lipasi degli adipociti, principali destinatari dei chilomicroni, idrolizza i trigliceridi presenti in essi in acidi grassi liberi (FFA) e glicerolo; lo stesso enzima idrolizza i trigliceridi presenti nelle VLDL provenienti dal fegato. Gli adipociti riassemblano gli acidi grassi e il glicerolo in trigliceridi che depositano in goccioline lipidiche, che in base alle necessità della cellula possono essere idrolizzati da specifiche lipasi ed essere utilizzati come fonte di energia. Questo meccanismo di accumulo, però, non è infinito e l'eccesso di acidi grassi liberi satura la via biosintetica dei trigliceridi, provocando l'accumulo degli acidi grassi nell'adipocita e il conseguente stress del reticolo endoplasmatico e stress ossidativo del mitocondrio [42]. Nei soggetti obesi

dunque, la sintesi di trigliceridi è diminuita con un aumento del rilascio in circolo degli acidi grassi liberi. Gli adipociti alterati a causa del sovraccarico di acidi grassi liberi, muoiono rilasciando il proprio contenuto; quest'ultimo recluta neutrofili e macrofagi, partecipando allo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico [43]. Il sovraccarico di acidi grassi liberi trasportati dal circolo nell'adipocita attraverso il trasportatore CD36/FAT induce un aumento intracellulare dei livelli di diacilglicerolo (DAG) con conseguente attivazione della protein chinasi C (PKC) che riduce la sensibilità insulinica. Quest'ultima, infatti, attiva la via di IKK e JNK che induce la fosforilazione in serina e la degradazione di IRS-1 e stimola la produzione e il rilascio di citochine pro-infiammatorie [44]. Gli acidi grassi liberi inoltre sono in grado di legarsi al Toll-like receptor 4 (TLR4) sulla superficie degli adipociti, attivando la via di NF-kB e di JNK [45]. Gli FFA in eccesso raggiungono anche la cellula muscolare, l'epatocita e la β -cellula del pancreas. Nel primo attivano la via IKK e JNK provocando la fosforilazione in serina delle IRS-1 e la loro degradazione, con riduzione della sensibilità insulinica. È noto che il tessuto muscolare utilizza gran parte del glucosio regolato dall'insulina, e quindi l'alterazione del segnale insulinico sulla miocellula provoca insulino-resistenza. Anche nell'epatocita avviene la fosforillazione in serina delle IRS e la loro degradazione da parte dell'accumulo degli FFA, con riduzione della sensibilità insulinica [46]. Quando vi è un eccesso di acidi grassi liberi anche il tessuto pancreatico inizia ad accumulare trigliceridi. Attraverso diversi meccanismi, come la formazione di ceramidi, l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e delta e l'aumento dello stress ossidativo, si sviluppa un danno con riduzione della massa delle β -cellule nel pancreas [47].

Deposizione ectopica di grasso: cause e conseguenze

Nelle ultime decadi, oltre alla distribuzione regionale del tessuto adiposo e al ruolo delle adipochine come responsabili delle alterazioni metaboliche nei soggetti obesi, l'attenzione è stata focalizzata anche sull'infiltrazione ectopica dei lipidi. Il grasso ectopico è definito come deposito di trigliceridi all'interno di cellule non appartenenti al tessuto adiposo come conseguenza dell'eccesso

di introito alimentare e della vita sedentaria [7]. Questa infiltrazione è causata dal fallimento del sistema di omeostasi del metabolismo lipidico all'interno degli adipociti bianchi, che dovrebbero prevenire la lipotossicità negli organi, confinando al proprio interno l'eccesso lipidico dovuto all'eccessivo introito calorico [48]. I meccanismi che portano a tale fallimento sono molteplici e probabilmente agiscono in modo sinergico: l'aumentato introito calorico con la dieta, la riduzione dell'ossidazione dei lipidi e l'alterazione dei processi di adipogenesi; sicuramente implicati in questi sono anche l'alterazione della secrezione delle adipochine e la produzione di citochine metabolicamente attive, caratteristiche dei soggetti obesi [49]. La deposizione di grasso ectopico è quindi un importante processo fisiopatologico, conseguenza delle alterazioni presenti nell'obesità ed anche causa di disfunzione e morte cellulare nei tessuti in cui è presente, fenomeni definiti lipotossicità e lipoapoptosi [50]. I tessuti caratterizzati da questi depositi sono principalmente: il fegato, il pancreas, il muscolo scheletrico, il cuore e il rene [7].

Infiltrazione lipidica del fegato

L'infiltrazione lipidica del fegato porta alla comunemente osservata steatosi epatica, conosciuta anche come steatosi epatica non alcolica (NAFLD). Quest'ultima è associata ad un aumento dell'insulino-resistenza epatica ed è molto comune nei pazienti con sindrome metabolica [51]. La prevalenza della NAFLD inoltre aumenta del 74% nei soggetti obesi e del 90% nei soggetti obesi con morbidità metabolica [52]. Studi recenti hanno evidenziato come l'obesità viscerale (VAT) sia fattore più importante per la genesi della steatosi epatica, rispetto all'indice di massa corporea (BMI) [53,54]. La causa della NAFLD non è ancora completamente chiarita, ma è noto vi siano implicati l'apporto di grassi con la dieta, gli FFA rilasciati dal tessuto adiposo e la lipogenesi de novo all'interno degli epatociti. Non è ancora completamente chiarito il meccanismo con cui la steatosi epatica porti all'insulino-resistenza, ma importante sarebbe il ruolo dei prodotti lipidici intermedi. L'aumento del diacilglicerolo (DAG) attiva la PKC che blocca l'attivazione delle IRS-1 e

IRS-2, questo a sua volta riduce l'attivazione della PI3-chinasi e di Akt. La conseguenza è il blocco del segnale insulinico [50]. Si riduce, quindi, l'accumulo di glicogeno e aumenta la produzione endogena di glucosio, contribuendo allo sviluppo di una ridotta tolleranza glucidica e al diabete. L'insulino-resistenza epatica è associata inoltre ad un aumento della concentrazione plasmatica di insulina, che a sua volta stimola la lipogenesi de novo, che contribuisce all'ulteriore incremento della steatosi epatica. In alcuni studi eseguiti in modelli animali si è osservato che l'insulina è in grado di aumentare l'espressione di SREB-1c che attiverebbe la trascrizione di molti geni implicati nella lipogenesi [55]. L'infiltrazione lipidica nel fegato, oltre all'insulino-resistenza, è implicata nello sviluppo di una lesione epatica di tipo infiammatorio.

E' nota, infatti, la possibilità dell'evoluzione della steatosi epatica non alcolica (NAFLD) in steato-epatite non alcolica (NASH). Sebbene la patogenesi di quest'ultima non sia ancora completamente chiarita, è stato suggerito che in seguito all'accumulo di acidi grassi, lo stress ossidativo giochi un ruolo importante. Vi sarebbe uno squilibrio fra agenti ossidanti (intermedi reattivi dell'ossigeno ROIs) e agenti antiossidanti, che porterebbe alla perossidazione lipidica [56]. Ne deriverebbe, quindi, danno cellulare diretto e successiva risposta del sistema immunitario che lo amplificherebbe, portando ad infiammazione e produzione di collagene con fibrosi progressiva [57]. Il sovraccarico del sistema di ossidazione degli FFA nell'epatocita provoca un danno ossidativo alla cellula stessa attraverso la disfunzione del mitocondrio e l'induzione del citocromo epatico CYP2E1 [58]. Quest'ultimo risulta aumentato negli epatociti dei soggetti con NASH; i chetoni e gli FFA sono substrati di questo citocromo e ne provocherebbero l'aumentata espressione. Il danno cellulare induce a sua volta la produzione di TNF- α , che ha un ruolo centrale nello sviluppo della risposta infiammatoria [59], trasformando un evento metabolico reversibile, come la steatosi epatica, in una condizione di danno permanente.

Infiltrazione lipidica del pancreas

Nei soggetti obesi si osserva la presenza di steatosi anche a livello pancreatico. Tale infiltrazione è sia interlobulare che intralobulare, con la presenza di adipociti all'interno del tessuto pancreatico. Studi immunoistochimici hanno dimostrato che i depositi lipidici vengono accumulati principalmente negli adipociti presenti fra le cellule esocrine [60], con la presenza tuttavia di un aumento dei trigliceridi anche all'interno delle cellule pancreatiche. Negli obesi l'aumentata lipolisi provoca elevati livelli di FFA circolanti e l'insulino-resistenza epatica provoca inoltre il rilascio da parte del fegato di particelle ricche di trigliceridi, i quali in associazione con l'alterazione della produzione di adipochine tipica dell'obesità, parteciperebbero all'infiltrazione lipidica del pancreas. Studi condotti nell'uomo hanno confermato, tramite valutazione con RMN, la presenza di grasso nel parenchima pancreatico e la correlazione tra obesità viscerale e infiltrazione lipidica del pancreas, nonché fra quest'ultima e l'insulino-resistenza [61]. Numerosi lavori, infatti riconoscono una relazione fra elevati livelli di FFA a livello pancreatico e la disfunzione della β -cellula [62]. Diversi meccanismi sono stati proposti per spiegare tale disfunzione: gli FFA, infatti, riducono la produzione d'insulina alterando l'espressione del gene della proinsulina e gli acil-CoA a catena lunga (LC-CoA) possono mediare gli effetti dannosi degli FFA sulla cellula beta. Gli acil-CoA a catena lunga possono attivare i canali K_{ATP} e iperpolarizzare la β -cellula, rendendo più difficile la depolarizzazione mediata dal glucosio, riducendo la secrezione insulinica glucosio-mediata. Le riserve di LC-CoA possono provocare riduzione dell'attività di specifiche isoforme di PKC, sopprimendo la loro azione incretinica sulla secrezione insulinica [51]. In aggiunta sembra che il palmitato induca la morte apoptotica della β -cellula e ne riduca la capacità proliferativa: elevati livelli di palmitato correlano con la sintesi de novo di ceramidi, i quali sono implicati nella via apoptotica di molte cellule, comprese le β -cellule del pancreas [63].

In sintesi, quindi, l'infiltrazione lipidica nelle isole pancreatiche provoca riduzione della secrezione insulinica e progressiva riduzione della massa di β -

cellule funzionanti con aumentata suscettibilità allo sviluppo di diabete di tipo 2. E' stato osservato infatti che nei pazienti diabetici la percentuale di grasso pancreatico supera di quasi il doppio quella di soggetti non diabetici (20.4% vs 9.7%) [62].

In definitiva l'interazione fra molti fattori ambientali, tra i quali un bilancio calorico in eccesso dovuto all'aumentato introito di cibo o alla riduzione dell'attività fisica, all'interno di un background genetico favorente, portano ad un particolare tipo di obesità caratterizzata da un aumento del tessuto adiposo viscerale. Questa è associata a insulino-resistenza, dislipidemia aterogena ed alla sindrome metabolica. Lo stato infiammatorio cronico associato all'obesità a prevalente deposizione centrale con la conseguente produzione di citochine metabolicamente attive, il rilascio in circolo di acidi grassi liberi, lo stato di leptino-resistenza e la riduzione dei livelli di adiponectina portano ad un incremento della lipolisi con aumentato rilascio di FFA verso tessuti diversi rispetto a quello adiposo (in particolare fegato, pancreas e muscolo) e alla riduzione della loro capacità di clearance e ossidazione, con la conseguente deposizione di grasso ectopico in questi organi. La successiva disfunzione d'organo provocata dalla lipotossicità e lipoapoptosi, e i diversi meccanismi di alterazione del segnale insulinico portano, infine, alle principali manifestazioni della sindrome metabolica.

Effetti del calo ponderale sulla distribuzione del grasso corporeo e deposizione ectopica di grasso

Numerosi studi hanno evidenziato che un decremento ponderale moderato compreso tra il 5 e il 10% del peso corporeo iniziale determina miglioramento delle alterazioni metaboliche associate all'obesità [64,65]; questo effetto è stato in gran parte attribuito a variazioni della distribuzione regionale del grasso corporeo. E' stato infatti osservato che il calo ponderale determina maggior decremento dell'adiposità viscerale rispetto a quella sottocutanea [66,67].

Più recentemente è stato osservato che il calo ponderale è in grado di determinare anche significativa riduzione dell'infiltrazione lipidica a livello epatico e muscolare [67].

Infatti recenti studi hanno documentato che il calo ponderale può sensibilmente influire sulla quantità di grasso intraepatico.

Colles et al [68] hanno dimostrato che due settimane di dieta fortemente ipocalorica sono in grado di determinare significativo decremento del grado di infiltrazione lipidica a livello epatico e che la riduzione del grasso intraepatico risulta essere fortemente correlata con la riduzione del peso corporeo ($p < 0.001$) e con il volume iniziale del fegato stesso ($p < 0.015$) [70].

Petersen et al [69] hanno dimostrato, in un gruppo di soggetti con diabete tipo 2, che una moderata perdita di peso (circa 8 Kg) ottenuta con dieta moderatamente ipocalorica, ha indotto normalizzazione della sensibilità insulinica e miglioramento dei livelli di glicemia a digiuno e che questi miglioramenti erano correlati con la perdita di grasso intraepatico risultata pari all' 81% ($p = 0.0009$).

Sato et al [70] hanno di recente confermato tali risultati osservando che una modesta perdita di peso (pari al 6% del peso iniziale) determina, in un gruppo di 13 obesi non diabetici, diminuzione dell'infiltrazione di grasso nel fegato (da livelli pre-calo ponderale di 12.9% a livelli post-calo di 8.2%) e normalizzazione di glicemia a digiuno.

In un recente trial randomizzato che ha coinvolto 130 soggetti con obesità severa nutrizionale sottoposti a intervento nutrizionale della durata di 12 mesi associato o meno a programma di attività fisica, è stato dimostrato che l'associazione con attività fisica è in grado di determinare perdita di peso maggiore e maggior riduzione del contenuto lipidico del fegato valutata mediante TAC [71].

E' stato osservato, in un gruppo di soggetti affetti da obesità morbigena, diabetici e non, che un significativo calo ponderale, indotto da bypass gastrico, risultava significativamente correlato a riduzione dell'infiltrazione lipidica del muscolo a livello della coscia valutata con istologia [64] e che

questo si associava a miglioramento della sensibilità insulinica misurato con HOMA [64].

Jansen et al. hanno inoltre dimostrato che la riduzione dell'infiltrazione lipidica del muscolo, valutata tramite RMN, può essere riscontrata anche in soggetti sottoposti a calo ponderale più modesto, di circa 10 kg, ottenuto con la sola dieta [72].

Uno studio più recente, condotto da Mazzali et al ha confermato tale dato anche in donne obese anziane, rilevando che un calo ponderale modesto, compreso entro il 5%, è in grado di ridurre significativamente sia l'adiposità centrale che l'infiltrazione lipidica a livello del muscolo della coscia, valutata con metodica TAC [73].

E' interessante notare che nessuno studio ha finora valutato gli effetti del calo di peso sulla deposizione di grasso a livello pancreatico in soggetti obesi.

Infiltrazione lipidica del muscolo scheletrico

L'esistenza di accumuli lipidici nel muscolo scheletrico umano fu descritta per la prima volta nel 1976 da Dagenais et al. attraverso l'analisi di campioni di biopsie muscolari dell'avambraccio [74].

Successivamente furono sviluppate metodiche microscopiche con l'utilizzo di specifici coloranti per quantificare il grasso situato all'interno della cellula sotto forma di lipidi intramiocellulari. Si è poi evidenziato che il grasso può essere stoccato a livello ectopico, non solo in tessuti come il muscolo scheletrico, ma anche in altri organi come fegato e pancreas [74].

Tuttavia fino all'avvento della Risonanza Magnetica con Spettroscopia gli studi sull'infiltrazione lipidica del muscolo rimasero comunque limitati all'analisi biochimica di campioni biotici di muscolo scheletrico.

È stato dimostrato l'infiltrazione lipidica muscolare si associa a correlati negativi sia da un punto di vista metabolico che funzionale.

Il primo a proporre l'esistenza di una correlazione tra infiltrazione lipidica del muscolo e insulino- resistenza fu Falholt nel 1985 con uno studio condotto in cani iperinsulinemici che mostravano maggiore contenuto di trigliceridi muscolari rispetto ai controlli normoglicemici [75]. Il concetto di insulino

resistenza come possibile correlato dell'infiltrazione lipidica muscolare fu proposto per la prima volta nel 1988 quando fu descritto in pazienti affetti da diabete di tipo 2 un contenuto di trigliceridi all'interno del muscolo retto addominale significativamente superiore rispetto ai gruppi di controllo sani [75].

Studi successivi hanno poi confermato la presenza di significativa associazione tra insulino-resistenza e accumulo di grasso intracellulare, sia in modelli animali che nell'uomo [76]. Kelley et al. [77] hanno dimostrato in pazienti obesi che l'infiltrazione lipidica muscolare, valutata mediante scansioni TC a metà coscia era un predittore di insulino resistenza migliore di adiposità viscerale, totale e del grasso sottocutaneo.

L'esistenza di una stretta relazione tra insulino-resistenza e infiltrazione lipidica muscolare sembra in parte in contraddizione con il "paradosso metabolico dell'atleta"[78].

E' infatti stato dimostrato nel muscolo di atleti molto allenati un elevato contenuto di lipidi muscolari, nonostante una buona insulino-sensibilità periferica [78]. Tale fenomeno fisiologico, definito come "paradosso metabolico", potrebbe essere dovuto a fenomeni di bilanciamento tra disponibilità degli acidi grassi in circolo, uptake cellulare e fenomeni di ossidazione [78]. Il grasso intramuscolare è infatti una fonte di energia durante l'esercizio fisico e esso decresce durante l'attività muscolare prolungata ed intensa ed è maggiormente stoccato in fibre muscolari ossidative di tipo I [79]. Nel 2001 Goodpaster dimostrò che l'associazione tra il contenuto intramuscolare di lipidi e l'insulino-sensibilità in atleti veniva influenzata dalle capacità ossidative del muscolo scheletrico stesso. E' stato ipotizzato che l'aumento della capacità di trasporto del glucosio nel muscolo scheletrico di soggetti allenati potrebbe facilitare la sintesi di trigliceridi intracellulari e allo stesso tempo aumentare la sensibilità all'insulina. L'aumento di grasso muscolare in persone sedentarie è dovuto ad un aumentato introito calorico, soprattutto della componente grassa, e non dovuta all'allenamento muscolare [78].

L'infiltrazione lipidica influisce negativamente non solo sul profilo metabolico muscolare, ma anche sulla funzione muscolare stessa ed è stata implicata nell'insorgenza di disabilità in età geriatrica.

Una riduzione della forza muscolare rappresenta infatti un importante fattore di rischio per declino della performance fisica e insorgenza di vera e propria disabilità. Con l'invecchiamento sono documentate una progressiva perdita della forza e della massa muscolare [80] con riduzione delle fibre muscolari di tipo II e diminuzione della forza contrattile [81]

In aggiunta a questi fenomeni entra in gioco con l'invecchiamento anche l'infiltrazione lipidica muscolare, considerato come uno dei fattori eziopatogenetici della perdita di massa muscolare e di forza età correlata, denominata anche Sarcopenia [82].

Tale infiltrazione lipidica può determinare alterazioni della contrattilità, del reclutamento delle fibre muscolari e del metabolismo muscolare.

L'esatto meccanismo attraverso cui l'infiltrazione lipidica è in grado di compromettere la forza muscolare e funzionalità fisica è comunque ancora in gran parte sconosciuto.

Metodiche di determinazione dell'infiltrazione lipidica del muscolo scheletrico

Prima di esaminare le diverse metodiche di indagine per lo studio del grasso ectopico muscolare bisogna distinguere tra due diverse tipologie di grasso e di infiltrazione muscolare:

- a) lipidi stoccati all'interno di adipociti che si trovano tra le fibre muscolari, detti lipidi extramiocellulari (extramyocellular lipid, EMCL) [83];
- b) lipidi situati all'interno delle miocellule sotto forma di triacilglicerolo citoplasmatico, lipidi intramiocellulari (intramyocellular lipid, IMCL) [83].

Le metodiche principalmente utilizzate possono essere suddivise in invasive (analisi biochimica, microscopio elettronico, analisi istochimica), svolte su campioni biotici, e metodiche di imaging non invasive (TC, RMN).

Analisi biochimica su biopsia

Viene utilizzata per quantificare il contenuto di IMCL su biopsie muscolari, dopo rimozione di tutto il grasso extramiocellulare visibile

macroscopicamente. I campioni vengono congelati e posti in cloroformio etanolo per l'estrazione e l'isolamento lipidico. La concentrazione finale di triacilglicerolo nella cellula è calcolata dalla quota di glicerolo o di acidi grassi rilasciata in soluzione. Anche se tutto il grasso extracellulare visibile viene rimosso dai campioni, una piccola quantità di tessuto adiposo residuo può alterare il risultato del test, che è gravato da una grande variabilità dei dati, rendendo questa metodica poco sensibile e inadatta al rilevamento di piccole differenze. Tuttavia, essendo una delle prime metodiche messe a punto, vi sono moltissimi studi in letteratura e una grande quantità di dati confrontabili.

Microscopio elettronico

Consiste in un'analisi morfometrica delle sezioni di biopsia muscolare con microscopio elettronico con ingrandimenti da 20000 x a 30000 x .Questa metodica riesce a descrivere la localizzazione mitocondriale delle gocce lipidiche, l'area di contatto tra gocce lipidiche e mitocondri, la localizzazione intracellulare dei lipidi (subsarcolemmale vs intramiofibrillare) e il tipo di fibra muscolare in esame. Inoltre i dati che si ricavano dall'analisi microscopica non sono influenzati dall' EMCL.

Lo svantaggio di questa metodica è che utilizza dei volumi muscolari molto ridotti, con un piccolo campionamento del muscolo in esame, oltre a costi elevati e a tecniche di analisi molto laboriose.

Analisi istochimica

Sezioni trasversali sottili di muscolo scheletrico possono essere trattate con Oil Red O (ORO) che permette di visualizzare le gocce lipidiche con una colorazione arancio-rossa all'osservazione al microscopio ottico.

L'acquisizione digitale di immagini e la seguente analisi quantitativa fornisce una stima in percentuale dell' area cellulare occupata da lipidi nel campione in esame.

A causa della fluorescenza del colorante il campione può essere anche analizzato attraverso un microscopio a fluorescenza con un software dedicato.

Ciò permette anche la simultanea analisi immunoistochimica sulla stessa sezione di muscolo.

Lo svantaggio di questa metodica è che ORO colora tutti i lipidi e quindi anche i metaboliti cellulari degli acidi grassi come per esempio il diacilglicerolo.

Tomografia computerizzata (TC) e risonanza magnetica (RMN)

Queste due metodiche di imaging determinano il contenuto di grasso muscolare in base alla diversa intensità di segnale data da grasso e tessuto muscolare. Tuttavia tali metodiche non riescono a distinguere alto IMCL ed EMCL. In particolare la TC distingue i diversi tessuti in base alle loro caratteristiche di attenuazione che dipendono a loro volta dalla densità del tessuto stesso [77] per cui ad esempio ridotti valori di attenuazione del muscolo sono indicativi di maggiore infiltrazione lipidica.

SCOPO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di confrontare il grado di infiltrazione lipidica di fegato e pancreas tra soggetti di sesso maschile e femminile prima e dopo aggiustamento per adiposità viscerale e valutare la relazione tra infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas, e fenotipo della distribuzione regionale del tessuto adiposo, adipochine, marker infiammatori, introito calorico e lipidico quotidiano.

Ulteriore scopo è stato quello di valutare gli effetti di un calo ponderale $> 7\%$ rispetto al peso iniziale sulla distribuzione regionale del grasso corporeo e sulla deposizione ectopica di grasso a livello di fegato e pancreas, valutando inoltre gli effetti di queste variazioni sul miglioramento metabolico osservato dopo calo ponderale.

Infine è stato eseguito studio di validazione rispetto all'esame istologico di metodica di misurazione del grasso intermuscolare a livello del muscolo erector spinae con risonanza magnetica, considerata il gold standard per la quantificazione del tessuto adiposo intermuscolare.

SELEZIONE DEL CAMPIONE IN STUDIO

Le ipotesi in studio sono state verificate in tre casistiche diverse di soggetti. Per convenzione le casistiche verranno identificate con CASISTICA A, B, C e D.

CASISTICA A

Un totale di 41 soggetti (20 uomini e 21 donne) con età media di 49.6 ± 12.6 anni, e indice di massa corporea (BMI) medio di $35.1 \pm 4.1 \text{ Kg/m}^2$, sono stati inclusi nello studio. Tutti i soggetti erano in buona salute, fatta eccezione per sovrappeso, obesità, ipercolesterolemia (51.6%), ipertensione (35.5%). Lo stato di salute è stato determinato attraverso accurata anamnesi ed esame obiettivo; sono stati eseguiti inoltre esame urine standard, esame emocromocitometrico e biochimico del plasma. Nessun paziente era affetto da diabete secondo i criteri dell'American Diabetes Association [84] ed il 12.9% era fumatore. Soggetti con glicemia a digiuno $\geq 7 \text{ mmol /L}$ (2 uomini e 1 donna) sono stati esclusi dallo studio e così pure soggetti con consumo giornaliero di alcol $>30 \text{ g}$ per gli uomini e $>20 \text{ g}$ per le donne [52]. Approssimativamente il 29% della popolazione in studio era in trattamento per ipertensione (9 soggetti, 7 uomini e 2 donne) e nessuno era in trattamento con statine. La presente analisi è stata eseguita su 38 soggetti (18 uomini e 20 donne, CASISTICA A) con età media di 49.1 ± 13.0 anni e indice di massa corporea (BMI) di $34.9 \pm 4.21 \text{ Kg/m}$. 7 donne erano in menopausa. Tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato e il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico della nostra università.

CASISTICA B

Allo scopo di confrontare i dati di infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas in soggetti obesi e magri sono stati inoltre raccolti dati di Risonanza magnetica e antropometria di 12 soggetti magri (6 uomini e 6 donne) con età media 47.2 ± 14.9 anni e BMI medio $22.8 \pm 2.1 \text{ Kg/m}^2$ utilizzati come gruppo di controllo.

CASISTICA C

Dei 38 soggetti arruolati al basale (CASISTICA A), 24 soggetti (13 uomini e 11 donne, CASISTICA C) hanno raggiunto calo ponderale $>7\%$ del peso iniziale e sono stati quindi sottoposti a valutazione dopo calo di peso.

In tutti i soggetti sono state valutate al basale e follow-up: variabili antropometriche (peso, altezza, BMI, circonferenza vita), composizione corporea (massa grassa e massa magra) con Dual Energy X-ray Absorptiometry, variabili metaboliche (glicemia, insulinemia, trigliceridi, indice HOMA), leptina, adiponectina, hsPCR, abitudini alimentari (apporto giornaliero di grassi con la dieta, introito calorico quotidiano); e tramite RMN quantità di tessuto adiposo viscerale (VAT), sottocutaneo (SCAT) e contenuto lipidico di fegato e pancreas.

CASISTICA D

Sono stati studiati diciotto uomini tra i 58 e gli 80 anni d'età, con un range di Indice di massa corporea (BMI) da 24.5 a 44 Kg/m². Tutti i soggetti sono stati selezionati tra i pazienti sottoposti a chirurgia elettiva per stenosi spinale (L4/L5) nel Dipartimento di Neurochirurgia dell'Ospedale Maggiore di Borgo Trento. Tutti i soggetti erano in buone condizioni generali di salute, come documentato da una anamnesi clinica accurata, da un esame obiettivo e da una batteria di esami ematochimici (emocromo, glicemia, indici di funzionalità epatica ed esame urine). Tutti gli individui risultavano a peso stabile nei sei mesi precedenti all'intervento e non presentavano evidenze cliniche di neoplasie, malattie renali, epatiche, tiroidee, malattie infiammatorie croniche, insufficienza cardiaca (classe NYHA3) e malattie polmonari gravi. Sono stati esclusi dallo studio soggetti con precedente diagnosi di Diabete Mellito di tipo 2. Non sono stati considerati eleggibili per lo studio pazienti ai quali era stata somministrata terapia steroidea e/o immunosoppressiva sia locale che sistemica nei precedenti sei mesi.

Nessuno dei soggetti risultava in terapia con insulina, tiazolidinedioni, farmaci ipoglicemizzanti orali, ipolipemizzanti o acido acetilsalicilico. Un uso

saltuario di FANS, definito come due somministrazioni di farmaco alla settimana, non è stato considerato come criterio di esclusione. Inoltre nessuno dei partecipanti svolgeva attività fisica regolare.

Tutti i partecipanti hanno dato il proprio consenso informato e il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato Etico del nostro ospedale.

MATERIALI E METODI

Misure antropometriche (CASISTICA A, B, C e D)

Ogni paziente è stato sottoposto a misurazione del peso corporeo, dopo essere stato spogliato degli indumenti pesanti e delle scarpe, con approssimazione di 0.1 Kg (Salus Scale, Milano), e a misurazione dell'altezza mediante l'uso di uno stadiometro, con approssimazione di 0.5 cm (Salus Stadiometer, Milano). È stato calcolato l'indice di massa corporea (BMI) come il rapporto fra peso in Kg ed altezza espressa in metri, elevata al quadrato (Kg/m^2). La circonferenza vita è stata misurata con un metro a nastro inestensibile, come la minima circonferenza tra processo xifoideo e ombelico.

Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA) (CASISTICA A, B, C e D)

La composizione corporea è stata misurata con la Dual Energy X-ray Absorptiometry (DXA). Tale metodica si avvale di una fonte di raggi X in grado di emettere fotoni a due diversi livelli di energia. I fotoni, attraversando i tessuti, a causa delle interazioni anatomiche che si verificano, subiscono un'attenuazione di intensità che viene rilevata da un detettore e registrata. L'entità delle interazioni anatomiche che si verificano dipende essenzialmente da due fattori: il numero atomico degli elementi attraversati e lo spessore del corpo in esame, fattori che favoriscono al loro aumentare l'assorbimento di energia fotonica [85]. Dal rapporto tra il valore di attenuazione subito dal raggio a più bassa energia e quello subito dal raggio a energia più elevata si ottiene un valore R che risulta tanto più elevato quanto maggiore è il numero atomico della sostanza attraversata.

Il corpo umano è formato da diversi elementi ed il valore R ottenuto è la risultante di diverse attenuazioni operate da elementi con numero atomico differente. I composti organici comprendono elementi come H, C, N, O, presentano bassi valori di R, mentre gli elementi minerali, come Na, K, Cl e Ca hanno valori elevati di R. Considerando quindi le strutture molecolari, i trigliceridi hanno il minimo valore R, i liquidi intra ed extra cellulari hanno viceversa un valore di R più elevato; i valori di R ancora più elevati

appartengono alla componente minerale dell'osso e ai cristalli di idrossiapatite.

La misurazione della composizione corporea mediante densitometria si basa sull'assunzione che il corpo umano consiste di tre compartimenti che possono essere distinti in base alla loro capacità di attenuazione dei raggi X: grasso, componente minerale ossea e massa alipidica non ossea. In realtà la macchina procede distinguendo prima l'osso dai tessuti molli e quindi, in questi ultimi, il grasso dalla massa alipidica non ossea. Nello studio da noi condotto è stato utilizzato il densitometro Hologic QDR 4500 dotato di software di analisi V5,67 A (Waltham, USA). Tutte le scansioni sono state analizzate da un singolo operatore esperto.

La massa grassa totale (FM) è stata espressa in Kg e come percentuale del peso corporeo (FM%). La massa magra non ossea è stata considerata come massa corporea totale a cui viene sottratta la massa grassa totale sommata alla massa ossea espressa in Kg.

Risonanza Magnetica

Acquisizione di immagini di RMN (CASISTICA A, B e C)

La RMN è stata eseguita con un magnete 1.5 Tesla (Symphony; Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany) e con bobine body phased-array coil, presso l'istituto di Radiologia del Policlinico di Verona.

Il protocollo di imaging includeva sequenza assiale pesata in T1 con un gradiente echo-sequenza in doppia fase (tempo di ripetizione msec / echo time msec, 96/2.33 per sequenze in fase opposta, 96/4.85 per sequenze in fase; flip angle 70 °; matrix 320x320; field of view 500 cm) dell'addome superiore e una sequenza assiale T1-ponderata con gradiente eco-sequenza (TR 90; TE 3,46; flip angle 70 °; matrix 256x256; field of view 500 centimetri) da L3 a L5. La qualità delle immagini è stata valutata da operatore esperto, con una scala da 1 a 5 (5 corrisponde ad immagine ottimale, 1 non-leggibile). La media della qualità delle immagini era di 4.1 (con un range compreso tra 3 a 5).

Valutazione del grasso addominale (CASISTICA A, B e C)

Tutte le immagini sono state analizzate in workstation dedicate con utilizzo di software Sliceomatic (versione 4.2; Tomovision, Montreal) e un singolo operatore ha misurato tessuto adiposo totale (TAT), tessuto adiposo viscerale (VAT) e sottocutaneo (SCAT) in una singola immagine a livello L4-L5 [86].

E' stato definito come SCAT l'area di tessuto adiposo compresa tra la cute e il perimetro esterno dei muscoli dell'addome. Tale area di tessuto adiposo sottocutaneo è stata poi divisa in superficiale (SCAT superficiale) e profonda (SCAT profondo), distinte in base alla loro posizione rispetto al piano della fascia abdominis, secondo il metodo precedentemente descritto da Johnson [87]. Tutti i pixel corrispondenti al tessuto adiposo localizzati all'interno del perimetro dei muscoli addominali e anteriormente al corpo vertebrale lombare sono stati valutati come VAT. Il TAT è stato calcolato addizionando SCAT e VAT ($TAT = SCAT + VAT$).

Il coefficiente di correlazione tra classi è stato 0.996 per SCAT, 0.993 per VAT, 0.995 per TAT, 0.994 per SCAT superficiale e profondo.

Valutazione infiltrazione lipidica di fegato e pancreas (CASISTICA A, B e C)

Le immagini sono state analizzate in una workstation dedicata (Leonardo, Siemens Medical Systems, Erlangen, Germany), da un singolo operatore con 6 anni di esperienza nella lettura di immagini di RMN dell'addome, che non era a conoscenza dei risultati clinici e laboratoristici dello studio. La tecnica utilizzata per misurare i valori di intensità del segnale (SI) dalle regioni di interesse (ROIs) nel fegato e nella milza, e per calcolare la relativa perdita di SI nel fegato e negli altri organi si è basata su metodi precedentemente descritti per il fegato [88]. La percentuale di perdita relativa di segnale individuata con la RMN è stata considerata misura ragionevole del contenuto lipidico del fegato sulla base del noto effetto che il grasso ha sui valori di SI. I valori di SI del fegato e della milza sono stati registrati con RMN in fase e in fase opposta pesata in T1, tramite il posizionamento dei ROIs su siti anatomici associati a sequenze, evitando visibili anomalie e eventuali artefatti. Sono state posizionate nel fegato tre ROIs circolari (nel lobo sinistro, in alto nel

lobo destro e più in basso sempre nel lobo destro) e tre nel pancreas (testa, corpo, coda, evitando il dotto pancreatico principale). La deviazione standard delle misurazioni di SI per ogni ROI è stata inferiore al 10%. L'intensità del segnale della milza è stata misurata in modo simile, posizionando due ROIs circolari nel parenchima splenico. La dimensione dei ROIs è stata diversa nei singoli organi: 1-2 cm di diametro per fegato e milza, uguale o minore per il pancreas. E' stata, quindi, calcolata una SI media è stata calcolata, per tenere conto della eterogeneità del segnale. Il contenuto di grasso nelle immagini RM in opposizione di fase è stato stimato come percentuale di perdita relativa di SI del fegato su immagini in fase opposta, con una formula precedentemente utilizzata in letteratura:

$$RSID = 100 \cdot (Lin/Sin - Lop/Sop)/(Lin/Sin)$$

in cui Lin è la SI epatica media in fase, Sin è la SI splenica media in fase, Lop è la SI epatica media in fase opposta e Sop è la SI splenica media in fase opposta. Formule simili sono state utilizzate per calcolare l'entità di grasso nel pancreas e nel muscolo psoas in accordo con studi precedenti [89-90]. E' stata eseguita analisi di riproducibilità in 17 soggetti di ambo i sessi e con ampio range di BMI. Le misurazioni dell'intensità di segnale in fase e in fase opposta nel pancreas sono state eseguite da due operatori esperti. Il coefficiente di variazione (CV%) interoperatore per la misurazione del contenuto lipidico del pancreas è risultato 9.57% con correlazione intraclassa di 0.975 e valore di Cronbach alpha di 0.987 (Figura 1).

Studio dell'infiltrazione lipidica del muscolo paraspinoso con RMN (CASISTICA D)

I soggetti sono stati posizionati supini su uno scanner di risonanza magnetica e il protocollo d'immagine ha impiegato circa sei minuti per soggetto.

Sono state ottenute sezioni trasversali a livello di L3-L4 utilizzando 1.0-T Siemens Armony Expert (Siemens AG, Erlangen, Germany) con una bobina di superficie per ogni soggetto è stata ottenuta una sequenza ad alta risoluzione pesata in T1.

I parametri di scanning per questa sequenza erano: TR 450, TE 15, Matrix 512x512, FOV 240mm, GAP 0.4mm, Averages 3, Scan time 5.48s, Voxel Size 0.8x0.5x4.0mm.

La valutazione dell'area muscolare e dell'infiltrazione lipidica del muscolo erector spinae (incluso il multifidus, il lunghissimus e l'ileocostalis) è stata eseguita a livello di L3-L4, che è considerato il livello dove l'area trasversale di tale muscolo è maggiore [91-92].

Un solo operatore con esperienza di quattro anni in analisi di composizione corporea con tecnica di imaging ha analizzato tutte le immagini utilizzando il software di analisi di immagine Sliceomatic (versione 4.2; Tomovision, Montreal Canada) e ha misurato l'area totale e l'IMAT (tessuto adiposo intermuscolare) del muscolo rettore spinale destro e sinistro.

IMAT è stato definito l'area di tessuto adiposo visibile tra i gruppi muscolari e sotto la fascia muscolare. I livelli d'intensità di grigio (valore soglia) del tessuto adiposo nella regione del SAT (tessuto adiposo sottocutaneo) è stato determinato e usato da riferimento [93]. Questo valore è stato ridotto di circa il 20% per identificare il valore soglia dell'IMAT del muscolo erector spinae; l'IMAT è stato poi quantificato. L'area muscolare è stata considerata come la differenza tra area totale (TA) e IMAT; è stato anche calcolato il rapporto IMAT/MA.

Sono stati usati i valori medi dei lati destro e sinistro per MA, IMAT e IMAT/MA.

È stata testata la riproducibilità intra operatoria per la misurazione della composizione del muscolo valutata con immagini di Risonanza Magnetica su un sottogruppo di 10 uomini selezionato in modo randomizzato (medie \pm DS: età 68.1 ± 7.6 anni, BMI 29.4 ± 3.1 kg/m²) per due volte, 4-8 settimane dopo. Le immagini di Risonanza Magnetica dei soggetti sono state poi poste in ordine randomizzato e i misuratori non erano a conoscenza dei risultati della prima sessione. Il coefficiente di correlazione intraclasse era 0.938 per TA, 0.985 per MA, 0.974 per IMAT e 0.982 per IMAT/MA.

Metodica di misurazione del grasso intermuscolare con istologia da biopsie di muscolo erector spinae (CASISTICA D)

Soggetti

Le biopsie di muscolo multifidus sono state prelevate all'inizio di intervento di chirurgia spinale a livello dell'incisione chirurgica (L3-L4), in modo standardizzato (al massimo 30 minuti dopo l'induzione dell'anestesia). Nessuno dei pazienti in studio aveva subito precedentemente interventi di chirurgia vertebrale.

Microscopia ottica

Le biopsie sono state fissate con paraformaldeide 4% in tampone fosfato 0.1M, pH 7.4 a 4°C, deidratato, lavato e immerso in paraffina. Sezioni di 3µm di spessore prese da tre diversi livelli (ogni 200µm) sono state tagliate in modo da ottenere campioni rappresentativi di tutto il campione bioptico. Tutte le sezioni sono state fissate con Ematossilina e Eosina per l'analisi istologica e morfometrica. Le osservazioni morfologiche sono state eseguite con microscopio ottico Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japan).

Morfometria

Per ogni paziente tre livelli di sezione del muscolo, fissati con ematossilina ed eosina, sono stati usati per misurare l'area occupata dall'infiltrato di tessuto adiposo nel muscolo come precedentemente riportato [94-96].

L'immagine di tutte le sezioni sono state fotografate con telecamera Nikon DXM 1200 con ingrandimento 10X. In ogni immagine, l'area di infiltrazione del tessuto adiposo e totale (TA = area tessuto adiposo + muscolo) sono state disegnate e misurate usando software dedicato (Lucia Image v.4.82, Nikon Instruments, Cz).

I risultati sono dati come % del rapporto area adipocitaria/TA di tre livelli (Histology adipocyte area/TA). E' stata utilizzata la media della percentuale del rapporto area adipocitaria/TA dei tre differenti livelli.

L'area di fibrosi contenente goccioline lipidiche isolate perilipina negative di differenti dimensioni sono state calcolate in un sottocampione di 5 soggetti

selezionati in modo casuale (3 uomini e 2 donne, età media 71.2 ± 10.3 anni, BMI medio 30.76 ± 6.9 Kg/m²). I valori medi delle aree perilipina negative sono il 10.95 ± 2.72 % con range compreso tra 7.88 e 15.45.

Immunoistochimica

Sezioni di 3µm sono state incubate seguendo la metodica Avidin-Biotin Peroxidase Complex method (ABC) seguendo questi step: 1) idrogeno perossido al 3% per inattivare la perossidasi endogena; 2) siero normale di capra (1:75); 3) anticorpi anti-perilipina di coniglio alla diluizione di 1:300 dilution (procurati da A. Greenberg, Boston), a 4°C; 4) anticorpi di capra anti-IgG di coniglio coniugate con biotina, 1:200 (Vector Labs, Burlingame, CA); 5) ABC complex (Vector Labs, Burlingame, CA); 6) visualizzazione enzimatica con Sigma Fast come cromogeno. Test di specificità sono stati eseguiti con omissione dell'anticorpo primario. Le sezioni sono state fissate con ematossilina su Eukitt (Fluka Germany).

Valutazione introito calorico giornaliero (CASISTICA A)

Una dietista esperta ha somministrato anamnesi alimentare di 7 giorni precedenti per stabilire le abitudini alimentari di ciascun soggetto arruolato nello studio. E' stata utilizzata griglia per il dietary recall dei 7 giorni che considerava tutte le occasioni di pasto quotidiane. Un booklet di immagini di cibi solidi e liquidi per le dimensioni delle porzioni è stato utilizzato durante la raccolta dell'anamnesi alimentare. La durata complessiva dell'anamnesi ha richiesto in media 40 minuti per ogni soggetto. I dati raccolti sono stati poi analizzati utilizzando software dedicato per calcolare l'apporto calorico quotidiano e quello specifico di proteine, di grassi, di carboidrati e di alcol, basato sulle tavole fornite dall'Istituto Italiano di Nutrizione [97].

Esami bioumorali

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a prelievi venosi a digiuno per tutti i parametri metabolici. La glicemia è stata misurata tramite glucose oxidase

method analyzer (Beckman Instruments Inc, Palo Alto, California, USA), metodo con coefficiente di variazione del 1.5%.

L'insulina plasmatica è stata misurata tramite metodo radioimmunologico con doppio anticorpo usando un kit commerciale (Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA, USA). La sensibilità della metodica era di 6 pmol/L e il coefficiente di variazione inter-campione del 4.9%.

L'insulino-resistenza è stata valutata tramite HOMA index (homeostasis model assessment of insulin resistance). Tale indice viene calcolato utilizzando la seguente formula:

Glicemia a digiuno (mmol/L) \times Insulinemia a digiuno (μ U/ml)/22.5 [98].

I livelli di colesterolo e di trigliceridi sono stati determinati usando un analizzatore Technicon Auto (Technicon Inc, Co, Tarrytown, NY) e una precipitazione di magnesio-destrano è stata usata per separare le lipoproteine ad alta densità (HDL).

La leptina sierica è stata misurata usando specifico kit ELISA (DBC-Diagnostic Biochem Canada Inc, London, Ontario, Canada). La sensibilità era di 0.5 ng/ml e i coefficiente di variabilità (CV) inter e intra campione erano del 7.4% e del 9.6% rispettivamente.

L'adiponectina sierica è stata valutata con un kit commerciale ELISA (B-Bridge International, Inc. Sunnyvale, CA, USA). La sensibilità era 0.5 ng/ml e i coefficienti di variabilità inter e intracampione erano 5.2% e 3.5% rispettivamente.

L'hs-PCR è stata misurata con metodo immunoturbimetrico. Il campione è stato incubato con particelle di lattice rivestite di anticorpo specifico per la hs-PCR; la quantità di aggregati che si formano è correlata con la concentrazione di hs-PCR del campione. L'aumento di torbidità che accompagna l'aggregazione è stata misurata turbidimetricamente e, mediante una apposita funzione matematica, è stata determinata la concentrazione della hs-PCR (mg/L). Il limite inferiore di rilevabilità era di 0.5 mg/L; l'intervallo di riferimento era 3 mg/L, che corrisponde al 90° percentile dei valori di una popolazione di riferimento. La variabilità analitica era del 5%.

Trattamento dietetico (CASISTICA A e C)

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a restrizione dietetica di 500 kcal/die rispetto al dispendio energetico a riposo valutato con calorimetria indiretta moltiplicato per 1.4. La perdita di peso media dopo sei mesi è stata dell' 8.9% rispetto al peso corporeo iniziale. Ogni soggetto ha mantenuto regime dietetico caratterizzato da: 62% di carboidrati, 24% di grassi, 14% di proteine e 20 g di fibra giornalieri, suddivisi in tre pasti quotidiani.

Calorimetria indiretta (CASISTICA A)

La spesa energetica a riposo è stata calcolata in tutti i soggetti al mattino dopo una notte di digiuno (circa 12 ore) mediante calorimetria indiretta, usando il metodo del cappuccio di ventilazione (Vmax 29 N Sensomedics). I soggetti erano sdraiati in posizione supina con un involucro di plastica rigida e trasparente sul capo, attraverso il quale veniva fatta circolare aria in quantità costante. L'ossigeno consumato e l'anidride carbonica prodotta sono stati analizzati e convertiti nella misura delle calorie consumate con l'equazione di Weir [99]. A tutti i soggetti è stato chiesto di astenersi da qualsiasi attività fisica o esercizio fisico il giorno precedente alla misurazione, per eliminare possibili effetti confondenti.

Analisi statistiche

I risultati sono presentati come medie \pm deviazioni standard. I valori delle variabili distribuite in modo non-normale sono state trasformate in scala logaritmica per approssimare la distribuzione normale. Le differenze delle variabili antropometriche, metaboliche e di composizione corporea fra soggetti magri e obesi e tra uomini e donne sono state valutate utilizzando il *t* test di Student per dati non appaiati. Per valutare la differenza del contenuto lipidico di fegato e pancreas tra uomini e donne è stata utilizzata l'analisi di covarianza, considerando VAT e sesso come covariata.

Analisi di correlazione sono state usate per valutare il grado di associazione tra infiltrazione lipidica di fegato e pancreas e le altre variabili in studio, anche dopo aggiustamento per tessuto adiposo viscerale.

Una regressione lineare è stata utilizzata per testare gli effetti di diverse variabili indipendenti sulla deposizione di grasso ectopico nel fegato e nel pancreas; solo le variabili che nell'analisi di correlazione semplice risultavano significativamente associate a infiltrazione lipidica di fegato e pancreas (coefficiente di Pearson <0.05) sono state scelte come variabili indipendenti nell'analisi di regressione.

Il t test per dati appaiati è stato utilizzato per valutare le variabili antropometriche, metaboliche e di composizione corporea prima e dopo il calo ponderale. Il test di McNemar è stato utilizzato per valutare la prevalenza della steatosi nei soggetti dello studio, prima e dopo la perdita di peso. L'analisi delle correlazioni semplici è stata usata per testare il grado di associazione tra modificazioni delle variabili. Una regressione multipla stepwise è stata utilizzata per testare gli effetti combinati della diminuzione del grasso ectopico, del calo ponderale e della variazione della distribuzione centrale del tessuto adiposo sulle modificazioni dei valori di HOMA dopo calo ponderale. Il livello di significatività statistica è di $p < 0.05$ per tutte le variabili in studio.

Tutte le analisi sono state effettuate tramite il pacchetto statistico SPSS 13.1 [100].

RISULTATI

Interrelazione tra composizione corporea, infiltrazione lipidica di fegato e pancreas, adipocitochine, insulino-resistenza e introito calorico (CASISTICA A e B).

Le caratteristiche cliniche della popolazione dello studio (media \pm DS) sono presentate nella Tabella 1 e 2. Sono stati inclusi nello studio 12 soggetti magri (età media 47.25 ± 14.88 anni e BMI medio 22.85 ± 2.11 , CASISTICA B) e un totale di 38 soggetti obesi (CASISTICA A), 18 uomini (età media 45.83 ± 13.40 anni e BMI medio 35.35 ± 3.25 kg/m²) e 20 donne (età media 52.10 ± 12.21 anni e BMI medio 34.60 ± 4.97 kg/m²). I soggetti obesi presentavano peso, circonferenza vita, SCAT, SCAT profondo, VAT, contenuto lipidico del fegato e del pancreas maggiore rispetto ai soggetti magri. In media è risultato che le donne rispetto agli uomini presentano altezza e peso significativamente minori, circonferenza della vita ($p < 0.01$) e VAT minore ($p < 0.01$), contenuto lipidico del fegato ($p < 0.001$) e del pancreas ($p < 0.05$) minore, leptina e adiponectina plasmatica a digiuno maggiore ($p < 0.01$), ALT e concentrazione insulinica minore ($p < 0.01$), indice HOMA minore ($p < 0.01$) e introito calorico totale minore ($p < 0.05$).

Dopo aggiustamento per VAT le differenze tra contenuto lipidico del fegato in uomini e donne obesi sono risultate attenuate, ma ancora significative ($p = 0.03$), mentre le differenze in contenuto lipidico del pancreas sono scomparse (dati non mostrati in Tabella).

In tabella 3 sono mostrate le correlazioni tra infiltrazione lipidica nel fegato e nel pancreas e caratteristiche antropometriche, variabili di composizione corporea e metaboliche, abitudini alimentari.

Il contenuto lipidico del fegato è risultato positivamente correlato a BMI ($r=0.36$, $p < 0.01$), circonferenza vita ($r=0.57$, $p < 0.001$), TAT ($r=0.54$, $p < 0.01$), SCAT profondo ($r=0.36$, $p < 0.05$), VAT ($r=0.62$, $p < 0.001$), trigliceridi plasmatici a digiuno ($r=0.48$, $p < 0.05$), insulina ($r=0.51$, $p < 0.001$), HOMA ($r=0.49$, $p < 0.01$), introito lipidico giornaliero ($r=0.34$, $p < 0.05$) e negativamente correlato all'adiponectina ($r=-0.49$, $p < 0.01$).

Dopo aggiustamento per sesso l'associazione fra contenuto lipidico del fegato e BMI, circonferenza vita, TAT, SCAT profondo, VAT, trigliceridi plasmatici a digiuno, insulina, hsPCR, HOMA e introito di grassi giornaliero è risultata attenuata, ma ancora significativa (dati non mostrati in tabella).

Il contenuto lipidico del pancreas è risultato positivamente correlato a circonferenza vita ($r=0.47$, $p<0.01$), VAT ($r=0.76$, $p<0.001$), trigliceridi ($r=0.34$, $p<0.05$), assunzione giornaliera di grassi con la dieta ($r=0.38$, $p<0.05$), e associato negativamente con l'adiponectina ($r=-0.39$, $p<0.05$).

Dopo aggiustamento per sesso l'associazione tra contenuto lipidico del pancreas, VAT, circonferenza vita e trigliceridi plasmatici a digiuno si è mantenuta significativa, mentre l'associazione con apporto di grassi, HOMA e adiponectina non era più presente.

Per valutare i predittori indipendenti di deposizione ectopica lipidica nel fegato e nel pancreas è stata eseguita una regressione multipla considerando il contenuto lipidico del fegato e del pancreas come variabili dipendenti e i parametri che avevano evidenziato più stretta associazione nelle analisi di correlazione lineare come variabili indipendenti. In Tabella 4 sono mostrati i differenti modelli nei quali sesso, VAT (o in alternativa peso e circonferenza della vita) e HOMA sono stati considerati come predittori indipendenti del contenuto di grasso ectopico del fegato.

Il 46% della varianza è risultato spiegato da sesso e VAT. Quando HOMA è stato aggiunto al modello un lieve incremento della varianza è stato osservato con una riduzione del valore del F test. Quando anche l'adiponectina è stata inclusa nel modello, non si è assistito ad ulteriore incremento della varianza ed il valore del test F è calato a 8.274 (dati non mostrati in tabella). Costruendo un modello considerando sesso, VAT e deep SCAT come variabili indipendenti, è stato spiegato il 53.4% della varianza del contenuto lipidico del fegato (dati non mostrati).

Il 43.2% e 37.7% della varianza era spiegato rispettivamente costruendo modelli considerando sesso e circonferenza vita o in alternativa sesso e peso corporeo. Sesso ed HOMA spiegavano il 37.5% della varianza del contenuto lipidico del fegato (dati non mostrati in Tabella).

In tabella 5 sono mostrati i differenti modelli di regressione lineare nei quali il contenuto lipidico del pancreas è stato considerato quale variabile dipendente e sesso, VAT (o in alternativa la circonferenza vita) e adiponectina come variabili indipendenti.

Il 59.2% della varianza del contenuto lipidico del pancreas era spiegato da sesso e VAT.

Considerando sesso e circonferenza vita come predittori del contenuto lipidico del pancreas, il modello spiegava il 23.6% della varianza. Includendo nei diversi modelli altre variabili (adiponectina, introito di lipidi con la dieta o età) in differenti combinazioni non sono state evidenziate ulteriori relazioni significative.

Effetti del calo ponderale su composizione corporea, infiltrazione lipidica di fegato e pancreas, adipocitochine e insulino-resistenza (CASISTICA C).

I valori medi \pm deviazioni standard delle variabili di composizione corporea prima e dopo calo ponderale e le rispettive modificazioni percentuali, sono presentate nella Tabella 6. Il calo ponderale medio ottenuto durante lo studio è stato dell'8.9%. E' stata osservata diminuzione significativa di BMI e circonferenza vita, dopo calo ponderale ($p < 0.001$) così come di massa grassa totale e massa grassa percentuale ($p < 0.001$), VAT, TAT, SCAT totale e profondo (tutti $p < 0.001$) contenuto lipidico del fegato e del pancreas ($p = 0.001$ e $p < 0.001$ rispettivamente).

In Tabella 7 sono presentati i valori medi \pm deviazioni standard delle variabili metaboliche e di leptina, adiponectina e hs-PCR prima e dopo calo ponderale. E' stato osservato significativo miglioramento di tutti i parametri metabolici, nonché dei livelli di leptina ($p < 0.01$) con esclusione di HDL che sono aumentate ma in modo non significativo ($p = 0.059$). Non è stata osservata invece modificazione dei valori di adiponectina. E' stata osservata significativa diminuzione di ALT ($p = 0.001$) e di hs-PCR ($p < 0.01$), mentre non si è osservata riduzione significativa di GGT ($p = 0.198$).

Confrontando le modificazioni dopo calo di peso delle variabili di composizione corporea e metaboliche nelle donne in premenopausa e in menopausa (n=4 e n=7, rispettivamente), le donne in premenopausa hanno presentato calo di peso (9.5 Kg contro 6.9 Kg), della massa grassa corporea e dei livelli di insulina significativamente maggiori. Considerando invece le modificazioni del contenuto lipidico del fegato e del pancreas, del grasso viscerale e sottocutaneo e delle altre variabili metaboliche non sono state osservate modificazioni significative tra i due gruppi (dati non mostrati in tabella).

Le Figure 2a e 2b rappresentano le modificazioni di infiltrazione lipidica di fegato e pancreas nei singoli soggetti. E' stato osservato decremento significativo di infiltrazione lipidica a livello epatico e pancreatico ($p < 0.001$ e $p=0.001$).

E' interessante notare che la diminuzione del contenuto lipidico nel fegato risulta essere maggiore ($84.1 \pm 3\%$) rispetto a quella del pancreas ($42.3 \pm 3\%$) e rispetto a quella del tessuto adiposo viscerale ($31.9 \pm 15.6\%$) e sottocutaneo ($13.6 \pm 25.9\%$) (Tabella 6).

All'inizio dello studio il 75% dei soggetti, ossia 18 soggetti su 24, presentava alla RMN un quadro di steatosi epatica; in particolare il 50% (12 soggetti su 24) presentavano steatosi di primo grado, 12.5% (3 soggetti su 24) steatosi di secondo grado e il 12.5% (3/24) steatosi di terzo grado. Dopo perdita di peso la percentuale di soggetti con steatosi epatica si è ridotta al 12.5% (3 soggetti su 24) e nessuno di questi presentava, dopo calo ponderale, steatosi di grado 2 e 3 ($p = 0.008$) (Figura 3).

In Tabella 8 sono mostrate le correlazioni tra modificazioni variabili antropometriche, composizione corporea, variabili biochimiche e modificazioni contenuto lipidico di fegato e pancreas e indice HOMA dopo calo di peso.

La variazione dell'infiltrazione lipidica del fegato è risultata correlata positivamente con la variazione di VAT ($p<0.001$), SCAT ($p=0.012$) e hs-PCR ($p=0.005$), mentre l'infiltrazione lipidica del pancreas è risultata essere positivamente correlata alla modificazione di VAT ($p<0.001$). E' stata inoltre

osservata associazione tra le rispettive modificazioni del contenuto lipidico del fegato e del pancreas ($p=0.033$).

Da modelli di regressione multipla nei quali contenuto lipidico epatico e pancreatico sono stati considerati come variabili dipendenti e le variabili correlate come variabili indipendenti, le modificazioni di VAT sono risultate il principale predittore della variazione di deposizione ectopica in entrambi gli organi, spiegando rispettivamente il 43.1% e il 30.7% della varianza (dati non mostrati in tabella).

La variazione dell'indice HOMA dopo calo di peso è risultata significativamente associata alle modificazioni di circonferenza vita, VAT, SCAT, TAT, contenuto lipidico del fegato e PCR ad alta sensibilità.

E' stata quindi eseguita regressione multipla stepwise considerando HOMA come variabile dipendente e come variabili indipendenti sesso, variazione del contenuto di lipidico di fegato e pancreas, nonché le variazioni dei valori di hs-PCR e del tessuto adiposo viscerale addominale (Tabella 9).

Il miglioramento dell'insulino-resistenza, è risultato essere predetto in modo indipendente dalle variazioni del contenuto lipidico del fegato.

In particolare le variazioni del contenuto lipidico di fegato dopo calo di peso spiegano da sole il 46.2% delle variazioni del miglioramento dell'insulino-resistenza e le modificazioni contenuto lipidico del fegato e della circonferenza vita il 61.6%. Inserendo nella regressione anche le variazioni di hs-PCR il modello era in grado di predire il 69.8% della varianza.

Validazione di metodica per la quantificazione del tessuto adiposo intermuscolare con risonanza magnetica rispetto a valutazione istologica (CASISTICA D).

La Tabella 10 mostra le caratteristiche della popolazione in studio (CASISTICA D). La riproducibilità intra-operatore della metodica di valutazione del grasso intermuscolare con RMN è stata eseguita in 10 soggetti di sesso maschile selezionati casualmente (età media 68.1 anni, BMI medio 29.44 kg/m²) valutati 2 volte, a distanza di 4–8 settimane. Il

coefficiente di correlazione intraclasse era 0.983 per TA, 0.985 per MA, 0.974 per IMAT and 0.982 per IMAT/TA.

L'associazione tra IMAT/TA valutata con istologia e IMAT/TA misurato con RMN utilizzando una riduzione del 20% e del 10% del livello di intensità di segnale del grasso sottocutaneo circostante sono presentati rispettivamente in Figure 4A e 4B. I coefficienti di correlazione di Pearson erano, rispettivamente, 0.792 e 0.843. Tuttavia, per valutare il grado di concordanza tra RMN e istologia abbiamo quantificato quanto le due modalità di quantificazione divergano dalla linea dei 45° usando i coefficienti di concordanza di Lin che sono risultati rispettivamente 0.299 e 0.490. Tale mancanza di concordanza tra le due metodiche è da ascrivere principalmente al bias relativo alla misurazione con RMN, quantificato con metodo Bland e Altman.

Nelle Figure 5A e 5B mostrano le differenze tra misurazione IMAT/TA con RMN con quantificati rispettivamente con riduzione del 20% e 10 % del livello di intensità di segnale rispetto al grasso sottocutaneo circostante e l'area di tessuto adiposo circostante valutata con istologia. IMAT/TA valutato con RMN in media superava la valutazione istologica di 21.79 % con intervallo di confidenza del 95% da 17.54 fino a 26.05 e di 12.42 % con intervallo di confidenza del 95% da 9.27 fino a 15.24, rispettivamente con riduzione del 20% e 10 % del livello di intensità di segnale rispetto al grasso sottocutaneo circostante). Tuttavia la correlazione tra rapporto e medie di IMAT/TA non è risultato significativo per entrambi (rispettivamente $r=0.36$, $p=0.146$ e $r=-0.17$, $p=0.500$).

La microscopia mostra che l'area di fibrosi contenente goccioline lipidiche perilipina negative occupa circa l' 8-15% di ogni sezione istologica esaminata (Figura 6).

DISCUSSIONE

Dai risultati di questa tesi emerge che nei soggetti di sesso femminile il grado di infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas è significativamente minore rispetto ai soggetti di sesso maschile. Come già descritto in studi precedenti [101] abbiamo osservato significative differenze tra uomini e donne nelle variabili di composizione corporea. Tali differenze sono rimaste significative anche dopo aggiustamento per grasso viscerale. Le donne rispetto agli uomini presentavano SCAT superficiale maggiore, SCAT totale e profondo minore VAT minore e minor contenuto lipidico del fegato e del pancreas.

In accordo con studi precedenti abbiamo osservato, sia nelle analisi trasversali che longitudinali dopo calo di peso, che l'infiltrazione lipidica del fegato è correlata in particolare con VAT, indipendentemente da età, sesso e numerosi fattori confondenti. È stato dimostrato che il tessuto adiposo viscerale rilascia acidi grassi liberi e adipochine, esponendo in questo modo il fegato all'accumulo lipidico. Nielsen et al usando metodiche con traccianti hanno riscontrato una diretta associazione fra la quantità di grasso viscerale e il rilascio di acidi grassi liberi verso il fegato [12].

Abbiamo inoltre osservato una correlazione fra deposizione ectopica di grasso nel fegato e SCAT profondo, ma non con SCAT superficiale. Le differenze nella distribuzione del tessuto adiposo addominale nella nostra popolazione possono in parte spiegare le differenze nell'infiltrazione lipidica epatica tra uomini e donne. La relazione tra tessuto adiposo sottocutaneo e infiltrazione lipidica del fegato è ancora dibattuta: tra gli studi che hanno utilizzato metodiche di imaging per determinare la massa grassa addominale, alcuni hanno riportato associazione significativa tra SCAT e NAFLD [53,102,103], altri non hanno trovato relazione [54,104,105]. Un diverso ruolo metabolico di SCAT profondo rispetto a quello superficiale è stato precedentemente dimostrato [10,106]. Kelley et al [10] hanno osservato che SCAT profondo, ma non SCAT superficiale, è fortemente associato ad insulino-resistenza periferica e alle caratteristiche della sindrome da insulino-resistenza nei soggetti non diabetici. Miyazaki et al [106] hanno dimostrato nei maschi, ma

non nelle femmine, associazione tra SCAT profondo ed indici di insulino-resistenza epatica. In realtà noi abbiamo osservato associazione significativa tra SCAT profondo, ma non SCAT superficiale e infiltrazione lipidica del fegato, indipendentemente dal sesso. Queste osservazioni sono in linea con il fatto che gli adipociti presenti nello SCAT profondo presentano maggiore attività lipolitica rispetto a quelli presenti nello SCAT superficiale [107] e questo potrebbe spiegare in parte la relazione tra insulino resistenza epatica e depositi di SCAT profondo [106].

I nostri risultati mostrano che l'apporto di grassi con la dieta è associato alla deposizione di grasso ectopico nel fegato e nel pancreas. Tali risultati sono in linea con studi precedenti che dimostrano che l'esposizione del fegato agli acidi grassi liberi dovuto all'introito lipidico con la dieta è fattore determinante dell'aumento del contenuto lipidico nel fegato. L'esposizione agli acidi grassi può essere dovuta all'apporto di grassi con la dieta e al rilascio di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo, specialmente da quello viscerale [108], determinando la deposizione di grasso ectopico nel fegato e nel pancreas. Questa ipotesi è stata recentemente confermata da Fraulob et al su modello murino con obesità indotta da eccesso calorico, dimostrando che i topi alimentati con pasti ad alto contenuto di grassi presentano aumentata deposizione di grasso ectopico nel fegato e pancreas [109]. Questi dati possono spiegare in parte il minor grado di infiltrazione lipidica del fegato nella donna osservato nel nostro studio: è stato dimostrato, infatti, che l'uomo presenta livelli più elevati di trigliceridi plasmatici dopo il pasto e livelli più elevati di acidi grassi liberi postprandiali rispetto alla donna [110].

A nostra conoscenza questo è il primo studio che considera la relazione tra contenuto lipidico del pancreas, misurato con RMN pesata in T1 in fase e in fase opposta, distribuzione regionale del tessuto adiposo e variabili metaboliche. Negli ultimi anni grande attenzione è stata dedicata all'infiltrazione lipidica nel pancreas, in quanto è stato suggerito che la deposizione di grasso all'interno e attorno alla β -cellula è implicata nell'alterazione della sua funzione [47].

Abbiamo osservato associazione tra contenuto lipidico del pancreas valutato con tecnica del chemical shift e VAT, che in un'analisi di regressione multipla è risultato essere il principale predittore di accumulo lipidico pancreatico. Tale associazione è stata confermata anche dalle osservazioni longitudinali dopo calo di peso. La forte associazione tra contenuto lipidico del pancreas, valutato con metodica ecografica, e VAT è stata precedentemente osservata in uno studio trasversale [61].

La relazione tra il rilascio di acidi grassi liberi dal tessuto adiposo viscerale e l'accumulo lipidico nel pancreas è stata solo parzialmente indagata in precedenza. In uno studio recente dove sono stati analizzati l'accumulo di acidi grassi e la loro composizione in topi con dieta ad alto contenuto lipidico e in un gruppo di controllo, è stato scoperto che i trigliceridi presenti nel pancreas erano composti da acidi grassi con profilo simile a quello del tessuto adiposo viscerale [111].

Nessuno studio ha valutato precedentemente la differenza nell'infiltrazione lipidica del pancreas nei due sessi. La nostra tesi ha osservato significativa differenza tra uomini e donne nel contenuto di grasso epatico e pancreatico. Abbiamo inoltre osservato che, dopo aggiustamento per VAT, differenze tra uomini e donne per infiltrazione lipidica del pancreas non erano più significative, mentre l'infiltrazione lipidica del fegato risultava ancora significativa, ma attenuata. Questo sembra confermare che le differenze tra uomini e donne nella deposizione di grasso nel fegato e pancreas sono principalmente correlate all'accumulo di VAT.

Le nostre osservazioni di una correlazione negativa fra adiponectina e contenuto lipidico epatico e pancreatico confermano e ampliano i risultati di studi precedenti [112,113]. Si ritiene che l'adiponectina protegga gli epatociti dall'accumulo di trigliceridi, probabilmente aumentando la β -ossidazione degli acidi grassi liberi e/o riducendo la produzione de novo di acidi grassi liberi all'interno degli epatociti [114]. In uno studio relativamente ampio, che ha coinvolto 80 pazienti con steato-epatite non alcolica (NASH), livelli più bassi di adiponectina erano indipendentemente associati con NASH [113]. In un altro studio, i livelli di adiponectina erano più bassi nei 174 pazienti con

NAFLD rispetto ai 42 di controllo e correlavano inversamente con la steatosi nei 116 pazienti sottoposti a biopsia epatica [115]. Questi dati potrebbero spiegare il minor grado di infiltrazione lipidica nel fegato nei soggetti di sesso femminile, in cui sono stati dimostrati livelli più elevati di adiponectina, anche dopo aggiustamento per BMI [116].

Nessun altro studio a noi noto ha valutato in precedenza la relazione fra contenuto lipidico del pancreas e adiponectina, ma lavori precedenti hanno dimostrato che l'ipoadiponectinemia potrebbe essere implicata nella disfunzione della β -cellula del pancreas, indipendentemente dall'accumulo di grasso viscerale e dalle abitudini alimentari [114].

Nel sottogruppo di soggetti sottoposti a calo ponderale (8.9% del peso iniziale), si è osservato decremento del contenuto lipidico del pancreas. Si è inoltre osservato che percentualmente il decremento del contenuto lipidico localizzato nel fegato è maggiore rispetto a quello localizzato nel pancreas e rispetto al decremento del tessuto adiposo viscerale e sottocutaneo addominale.

Dopo perdita di peso si è osservato significativo miglioramento dell'insulino-resistenza, valutata con HOMA, nonché diminuzione dei valori di leptina e hs-PCR, mentre i valori di adiponectina non si sono modificati. La diminuzione dell'infiltrazione lipidica epatica è risultata il più importante predittore del miglioramento dell'insulino-resistenza dopo calo ponderale.

In accordo con studi precedenti [117], anche nei soggetti di questa tesi, la diminuzione del tessuto adiposo viscerale è stata maggiore rispetto a quella che si è verificata nel tessuto adiposo sottocutaneo addominale. Tale risultato è inoltre in accordo con quanto di recente emerso in una revisione di tutti i lavori sugli effetti del decremento ponderale sulla distribuzione regionale dell'adipe che ha dimostrato come nella fase iniziale di un moderato calo ponderale avviene preferenzialmente decremento del tessuto adiposo viscerale, verosimilmente a causa della sua più spiccata risposta lipolitica [117].

I risultati di questa tesi che dimostrano un significativo decremento del grasso intraepatico dopo calo ponderale sono in linea con quanto riportato da Colles et al. [68] e Sato et al. [70]. Recenti studi hanno inoltre osservato che, dopo calo ponderale, si verifica riduzione del grasso intraepatico anche in soggetti con diabete di tipo 2 [69,118], nonché in soggetti sovrappeso [119] e in soggetti obesi anziani [120].

Nei soggetti di questa tesi un decremento di circa il 3% della massa grassa totale è risultato essere associato a diminuzione del contenuto di grasso intraepatico di circa l'80% rispetto ai valori rilevati alla valutazione basale. Nel campione di questo studio inoltre, i soggetti che presentavano steatosi epatica, stimata come una diminuzione dell'intensità del segnale alla RMN maggiore del 5% [121] erano il 75% all'inizio dello studio e si riducevano al 12.5% dopo calo ponderale. Questi dati sembrano dimostrare chiaramente che l'approccio basato sul calo di peso nei pazienti obesi deve essere considerato come prima scelta nel trattamento della steatosi epatica stessa.

Nessuno studio aveva finora analizzato le variazioni del contenuto lipidico pancreatico conseguente a calo ponderale. Nella nostra tesi si è assistito a decremento del contenuto lipidico pancreatico pari al 42% rispetto al contenuto iniziale.

La deposizione di tessuto adiposo nel parenchima pancreatico risulta di particolare rilevanza clinica, in quanto si è osservato che la presenza di lipidi all'interno delle isole di Langerhans e attorno ad esse è associata ad alterata funzionalità pancreatica [62]. L'accumulo di acidi grassi non esterificati nel parenchima pancreatico porta infatti a produzione di fattori proinfiammatori da parte del tessuto adiposo stesso e accumulo di metaboliti tossici [122]. Questi fattori sono in grado di determinare apoptosi delle cellule beta pancreatiche con conseguente diminuzione della produzione di insulina [122]. Sulla base di questi elementi è stata formulata da Unger la "teoria lipocentrica" dello sviluppo dell'insulino-resistenza: all'eccesso dell'introito calorico, il "primum movens" eziopatogenetico, segue iperinsulinemia che porta ad aumento della lipogenesi e incremento del grasso corporeo, cui segue

aumento del deposito di grasso ectopico (epatico, pancreatico, muscolare), con insulino-resistenza e lipotossicità delle cellule beta pancreatiche [122].

Lee et al. del resto hanno riscontrato, in soggetti con infiltrazione di grasso pancreatico valutato con RMN, aumento di insulino-resistenza, valutata con HOMA, oltre ad aumento di ALT, trigliceridi e colesterolo totale rispetto a un gruppo controllo ($p < 0.05$). E' stata inoltre osservata significativa associazione tra alterazioni del metabolismo glucidico e lipidico e grado di infiltrazione lipidica pancreatica [61].

Nei soggetti valutati in questo studio si è osservato significativo decremento di grasso intrapancreatico dopo perdita di peso, il che potrebbe avere contribuito a determinare effetti positivi sul metabolismo glucidico, sebbene dal modello di regressione multipla non sia emerso effetto indipendente della riduzione del contenuto lipidico del pancreas nel predire il miglioramento dell'insulino-resistenza associato a calo di peso.

I dati presenti in letteratura hanno evidenziato che steatosi epatica e pancreatica sono strettamente correlate tra loro; Lee et al. hanno infatti osservato, in uno studio condotto in soggetti obesi in cui la deposizione di grasso ectopico è stata analizzata tramite RMN, che nel 70% dei soggetti erano presenti contemporaneamente sia steatosi epatica che pancreatica e che solo 2% dei soggetti presentavano steatosi epatica isolata [61]. Dai dati di questa tesi sembra emergere che la diminuzione del grasso intraepatico conseguente calo di peso, se pur consensuale con quello del grasso intrapancreatico, è di maggiore entità. Si è osservato infatti un decremento dell'infiltrazione lipidica del fegato percentualmente quasi doppia rispetto a quella del pancreas.

I risultati di questa tesi risultano essere almeno parzialmente in accordo con quelli di Colles et al. [68] i quali hanno dimostrato che il grasso intraepatico viene mobilizzato più velocemente rispetto al grasso viscerale.

Come già dimostrato in altri studi [119] dopo calo ponderale moderato si è osservato miglioramento dei parametri metabolici, con diminuzione dei valori di glicemia a digiuno, HOMA, colesterolo totale e trigliceridi.

In accordo con precedenti studi [73] si è osservato che i livelli di leptina diminuiscono dopo calo di peso. Questa diminuzione, assieme alla diminuzione dei valori di hs-PCR, potrebbe di per sé contribuire al miglioramento dell'insulino-resistenza.

Nessuna significativa variazione dei valori di adiponectina è invece emersa. Tale risultato è in accordo con precedenti studi, i quali avevano suggerito che un decremento ponderale del 5% non è in grado di determinare aumento dei livelli di adiponectina in soggetti obesi con normale tolleranza al glucosio [123]. Altri studi avevano invece segnalato la riduzione dell'adiponectina dopo di peso superiore al 10% [34,124] o in soggetti con alterata tolleranza glucidica [125].

Nei soggetti del nostro studio il miglioramento dell'insulino-resistenza è risultato essere predetto dalle variazioni del contenuto lipidico del fegato in modo indipendente dalle variazioni di tessuto adiposo viscerale addominale, leptina e hs-PCR [67].

Questi dati sono in linea con le recenti osservazioni di Koska et al. [126], i quali hanno osservato che l'infiltrazione lipidica del fegato è strettamente associata allo sviluppo di insulino-resistenza periferica ed epatica, indipendentemente dai livelli di adiponectina e di grasso viscerale.

Sebbene il rapporto IMAT/TA valutato con RMN è significativamente associato con la valutazione istologica spiegando dal 63% fino all' 82% della varianza in base alla soglia utilizzata per distinguere il tessuto adiposo intermuscolare dal muscolo, con una sovrastima della metodica con RMN, come mostrato nei plot delle correlazioni Bland Altman mostrati in Figura 5A e 5B. Tuttavia questo risultato non è inaspettato per diverse ragioni. In primo luogo, l'estrapolazione del tessuto adiposo intermuscolare contenuto in sezioni trasverse di biopsie rappresentative di tutto il muscolo erector spine rispetto al tessuto adiposo intermuscolare di una scansione trasversale misurato con RMN è difficoltosa, particolarmente perché la variabilità del contenuto lipidico nelle differenti sezioni trasversali istologiche è piuttosto elevata. Tuttavia ciò non sembra essere rilevante

almeno nel nostro studio considerando che le differenze rilevate nelle differenti sezioni istologiche sono ridotte e non significative. Secondo la colorazione con Ematossilina e Eosina usata per le analisi morfologica dei preparati istologici e l'uso di anticorpi anti-perilipina permette di visualizzare adipociti (che risultano perilipina positivi), ma non goccioline lipidiche isolate nell'interstizio tra le fibre muscolari. La stima che l'8-15% della sezione bioptica muscolare sia occupata da goccioline lipidiche perilipina negative di varia dimensione può parzialmente spiegare le differenze osservate tra la valutazione istologica e quella con RMN. Inoltre, correggendo per il bias tra le due metodiche, il grado di concordanza quantificato con il coefficiente di correlazione di Lin incrementava significativamente.

Alcune limitazioni di questo studio devono essere riconosciute. In primo luogo, il numero ridotto dei soggetti studiati. In secondo luogo sebbene in numerosi studi è stata utilizzata la spettroscopia per valutare il contenuto lipidico del fegato, per la nostra tesi è stata utilizzata RMN con sequenza pesata in T1 in fase e in fase opposta. Tuttavia recentemente è stato dimostrato che la tecnica RMN in fase e in fase opposta è un valido e affidabile strumento per la quantificazione sia del grasso epatico che di quello pancreatico, con risultati sovrapponibili a quelli ottenuti con la risonanza magnetica a spettroscopia [127]. Nel presente studio abbiamo utilizzato per quantificare il grasso pancreatico immagini di RMN con sequenze T1 pesate in fase e in fase opposta. Queste metodiche sono considerate ormai di routine nei protocolli di imaging di RMN per il fegato, principalmente utilizzati per ricercare e quantificare la steatosi epatica, e potrebbero diventare, in futuro, metodiche di riferimento per la valutazione del grasso pancreatico nella normale pratica clinica. I dati di riproducibilità hanno evidenziato affidabilità della metodica con risultati anche migliori rispetto a quanto riportato in letteratura per la valutazione del contenuto lipidico del pancreas con spettroscopia (62).

Abbiamo utilizzato, inoltre, come marker di insulino-resistenza l'indice HOMA. L'utilizzo di un approccio cognitivo-comportamentale nel quale il

calo ponderale venga affiancato a programma di attività fisica strutturata potrebbe rivelarsi un'opzione terapeutica efficace con effetto più che additivo nel trattamento dell'infiltrazione lipidica del pancreas come precedentemente riportato per NAFLD [128].

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Nella popolazione in studio (CASISTICA A e B) è emerso che:

1. Le donne hanno minor grado di infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas rispetto agli uomini.
2. Il tessuto adiposo viscerale è il principale predittore di deposizione di grasso ectopico sia nel fegato che nel pancreas.
3. Il tessuto adiposo sottocutaneo profondo è predittore indipendente di infiltrazione lipidica nel fegato.
4. L'apporto di grassi con la dieta è associato all' infiltrazione lipidica di fegato e pancreas.
5. Vi è correlazione negativa tra adiponectina e deposizione di grasso ectopico sia nel fegato che nel pancreas.

Nella sottopopolazione che ha raggiunto calo ponderale $>7\%$ del peso corporeo iniziale (CASISTICA C) si sono osservati:

1. Significativo decremento di BMI, circonferenza vita e percentuale di massa grassa.
2. Decremento dei valori di glicemia a digiuno, HOMA, ALT, leptina e hs-PCR.
3. Significativo decremento di tessuto adiposo addominale totale, sottocutaneo e viscerale.
4. Significativo decremento del contenuto lipidico nel fegato ($84.1 \pm 3\%$) e nel pancreas ($42.3 \pm 3\%$).
5. Significativa riduzione della percentuale di soggetti con steatosi epatica alla RMN (75% all'inizio dello studio, 12.5% dopo calo ponderale; $p = 0.008$).
6. Miglioramento del grado di infiltrazione lipidica nel fegato nei pazienti con steatosi epatica alla valutazione basale.
7. La riduzione del tessuto adiposo viscerale associata a calo di peso è risultata il principale predittore del calo del contenuto lipidico sia del fegato che del pancreas.

8. La diminuzione dell'infiltrazione lipidica epatica è risultata principale predittore di miglioramento dell'insulino-resistenza dopo calo ponderale, indipendentemente dalle modificazioni di adiposità viscerale e infiammazione sistemica.

Nella sottopopolazione di soggetti anziani sottoposti a misurazione con RMN e istologica del tessuto adiposo intermuscolare a livello del muscolo erector spinae (CASISTICA D):

1. IMAT valutato con RMN ha mostrato buona concordanza con l'infiltrazione lipidica misurata con istologia.
2. Modificando il cutoff tra muscolo e IMAT riducendo del 10% il livello di intensità di grigi del tessuto sottocutaneo circostante è stato osservato miglioramento della concordanza tra le due metodiche.
3. Il rapporto IMAT/TA presenta tuttavia ancora bias di sovrastima circa del 12% tra le due metodiche.

In conclusione, in questo gruppo di soggetti obesi le donne hanno minor grado di infiltrazione lipidica del fegato e del pancreas rispetto agli uomini; Il tessuto adiposo viscerale è il principale predittore di deposizione di grasso ectopico sia nel fegato che nel pancreas.

Un calo ponderale moderato determina significativo miglioramento non solo della distribuzione regionale dell'adipe, ma anche dell'infiltrazione lipidica epatica e pancreatica. La mobilitazione dell'adipe localizzato in sede ectopica sembra, per lo meno in termini percentuali, essere ancor più importante di quella del tessuto adiposo addominale viscerale. Un calo ponderale moderato riduce significativamente la prevalenza della steatosi epatica e determina in tutti i soggetti miglioramento del grado di steatosi.

I risultati di questo studio inoltre dimostrano che anche l'adipe localizzato a livello pancreatico può essere mobilitato dopo moderato decremento ponderale.

L'infiltrazione lipidica valutata con RMN ha mostrato buona associazione con il corrispettivo istologico. L'utilizzo di una nuova soglia tra muscolo e tessuto

adiposo ha determinato un miglioramento della concordanza tra i risultati ottenuti con le due metodiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2522-2525.
- [2] Pandark YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR, Heymsfield SB. The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern Med* 2003; 163: 427-436.
- [3] Jakobsen MU, Berentzen T, Soresen TIA, Overvad K. Abdominal Obesity and Fatty Liver. *Epidemiologic Reviews* 2007.
- [4] Goodpaster BH, Theriault R, Watkins SC, *et al.* Intramuscular lipid content is increased in obesity and decreased by weight loss. *Metabolism* 2000; 49: 467-472.
- [5] Shen W, Wang ZM, Punyanita M *et al.* Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. *Obesity Research* 2003; 11: 5-16
- [6] Bosello O, Zamboni M. Visceral obesity and metabolic syndrome. *Obesity Reviews* 2000; 1: 47-56.
- [7] Rasuoli N, Molavi B, Elbein SC, Kern PA. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diab Obes Metab* 2007; 9: 1-10.
- [8] Vague J. The degree of masculine differentiation of obesity: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout and uric calculus disease. *Am J Clin Nutr* 1956; 4: 20-34.

- [9] Krotkiewski M, Bjorntorp P, Sjostrom L, Smith U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 1983; 72: 1150-1162.
- [10] Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivision of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278: E941-E948.
- [11] Goodpaster BH, Krishnaswami S, Harris TB *et al.* Obesity, regional body fat distribution, and metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med* 2005; 165: 777-783.
- [12] Nielsen S, Guo ZK, Johnson MC *et al.* Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest* 2004; 113: 1582-1588.
- [13] Jakobsen MU, Berentzen T, Soresen TIA, Overvad K. Abdominal Obesity and fatty liver. *Epid Rev* 2007; 1-11.
- [14] Karla M. Pou, Joseph M. Massaro, Udo Hoffmann, Ramachandran S. *et al.* Visceral and Subcutaneous Adipose Tissue Volumes Are Cross-Sectionally Related to Markers of Inflammation and Oxidative Stress: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2007; 116: 1234-1241
- [15] Einstein FH, Atzmon G, Yang XM *et al.* Differential response of visceral and subcutaneous fat depots to nutrients. *Diabetes* 2005; 54: 672-678.
- [16] Rexford S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity* 2006; 14: 242-246.
- [17] Fasshauer M, Paschke R. Regulation of adipocytokines and insulin resistance. *Diabetologia* 2003; 46: 1594-1603.

- [18] Friedman JM, Halaas JL. Leptin and regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998; 395: 763-770.
- [19] Muoio DM, Dohm GL, Fiodorek FT Jr, Tapscott EB, Coleman RA. Leptin directly alters lipid partitioning in skeletal muscle. *Diabetes* 1997; 46: 1360-1363.
- [20] Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD, Fryer LG, Muller C, Carling D, Kahn BB. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002; 415: 339-343.
- [21] Niswender KD, Baskin DG, Schwartz MW. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15: 362–9.
- [22] Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, *et al.* Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* 1996;334:292–5.
- [23] Munzberg H, Myers MG Jr. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci.* 2005; 8:566 –70.
- [24] Unger RH. Longevity, lipotoxicity and leptin: the adipocyte defense against feasting and famine. *Biochimie* 2005; 87: 57-64.
- [25] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* 2005;26:439 –51.
- [26] Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, *et al.* Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes.* 2001;50: 1126–33.

- [27] Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003; 423: 762–9.
- [28] Yamauchi T, Kadowaki T Physiological and pathophysiological roles of adiponectin and adiponectin receptors in the integrated regulation of metabolic and cardiovascular diseases.
- [29] Louthan MV, Barve S, McClain CJ, Joshi-Barve S. Decreased serum adiponectin: an early event in pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr* 2005; 147: 835-882.
- [30] Trayhurn P, Wang B, Wood S. Hypoxia and the endocrine and signalling role of white adipose tissue. *Archives of Physiology and Biochemistry*, October 2008; 114(4): 267–276
- [31] Houstis N, Rosen ED, Lander ES.. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006 440:944–48.
- [32] Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004; 306:457–61.
- [33] Trayhurn P, Wood IS.. Adipokines: Inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92:347–55.
- [34] Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H.. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1023–33.

- [35] Kabon B, Nagele A, Reddy D, Eagon C, Fleshman JW, Sessler DI, Kurz A. Obesity decreases perioperative tissue oxygenation. *Anesthesiol* 2004; 100:274–80.
- [36] Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H, Arai T, Fukuda K, Kita T, Adachi T, *et al.* Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006; 291:C104–13.
- [37] Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of Tumor Necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91
- [38] Hotamisligil GS, Perardi P, Budaveri A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996; 271: 665-668.
- [39] Vozarova B, Weyer C, Hanson K, P. Tataranni A, Bogardus C, Pratley RE. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res.* 2001;9:414–417
- [40] Senn J, Klover PJ, Nowak A, and Mooney RA. Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. *Diabetes* 2002; 51:3391–3399.
- [41] Eder K, Baffy N, Falus A, Pulon AK. The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity. *Inflamm research* 2009; 58: 727-736.
- [42] de Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 2008; 54: 945-955.

- [43] Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-1808.
- [44] Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang Q, *et al.* Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinase in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 2024-2034.
- [45] Song MJ, Kim KH, Yoon JM, Kim JB. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 739-745.
- [46] Capeau J. Insuline resistance and steatosis in humans. *Diabetes Metab* 2008; 34: 649-657.
- [47] Tushuizen ME, Bunck MC, Pouwels PJ, Bontemps S, *et al.* Pancreatic fat content e beta-cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2916-2921.
- [48] Unger RH. Minireview: weapons of lean body destruction: the role of ectopic lipids in the metabolic syndrome. *Endocrinology* 2003; 144: 5159-5165.
- [49] Heilbronn L, Smith SR, and Ravussin E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International Journal of Obesity* 2004; 28: S12–S21.
- [50] van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiology & Behavior* 2008; 94: 231-241.

- [51] Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003; 37: 917–923.
- [52] Angulo P. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol* 2002; 1: 12-19.
- [53] Thomas EL, Hamilton G, Patel N, O'Dwyer R, Dorè CJ, Goldin RD, Bell JD, Taylor-Robinson SD. Hepatic triglyceride content and its relation to body adiposity: a magnetic resonance imaging and proton spectroscopy study. *Gut* 2005; 54: 122-127.
- [54] Eguchi Y, Eguchi T, Mizuta T, Ide Y, Tasutake T, Iwakiri R, *et al.* Visceral fat accumulation and insulin resistance are important risk factor in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2006; 41: 462-469.
- [55] Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999; 274: 30028–30032.
- [56] McCulloch AJ. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: S17-S29.
- [57] Aronis A, Madar Z, Tirosh O. Mechanism underlying oxidative stress-mediated lipotoxicity: exposure of J774.2 macrophages to triacylglycerols facilitates mitochondrial reactive oxygen species production and cellular necrosis. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1221-1230.
- [58] Lieber CS, Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role, *Physiol Rev* 1997, 77: 517–544.
- [59] Diehl AM. Tumor necrosis factor and its potential role in insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease. *Clin liver dis* 2004; 8:619-38.

- [60] Pinnick KE, Collins SC, Londos C, Gauguier D, Clark A, Fielding BA. Pancreatic ectopic fat in characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity* 2008; 16.
- [61] Lee. Clinical implications of fatty pancreas: correlations between fatty pancreas and metabolic syndrome. *World Journal of gastroenterology* 2009; 15:1869-1875.
- [62] Tushuizen M, Bunk MC, Puowels PJ, Bontemps S, Waesberghe J, Schindhelm R, Mari A, Heine R, Diamant M. Pancreatic fat content and Beta cell function in men with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 2916-2921.
- [63] Newsholme P, Keane D, Welters HJ, Morgan NG. Life and death decision of the pancreatic β -cell: the role of fatty acid. *Clinical Science* 2007; 112: 27-42.
- [64] Gray RE, Tanner CJ, Pories WJ, MacDonald JG, Houmard JA. Effect of weight loss on muscle lipid content in morbidly obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284 :726 –32.
- [65] Malenfant P, Tremblay A, Doucet E, Imbeault P, Simoneau J-A, Joannisse DR. Elevated intramyocellular lipid concentration in obese subjects is not reduced after diet and exercise training. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280 :632 –9.
- [66] Greco A, Mingrone G, Giancaterini A, et al. Insulin resistance in morbid obesity. Reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002; 51 :144 –51.
- [67] Esposito K, Pontillo A, Di Palo C, et al. Effects of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women. *JAMA* 2003; 289 :1799 –804.

- [68] Colles S, Dixon J, Marks P, Strass B, O'Brien P. Preoperative weight loss with a low energy diet: quantitation of changes in liver and abdominal fat by serial imaging. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:304-311.
- [69] Petersen et al. Reversal nonalcoholic hepatic steatosis, hepatic insulin resistance and hyperglycemia by moderate weight reduction in patients with type 2 of diabetes. *Diabetes*, 2005; 54: 603-608.
- [70] Sato F, Tamura Y, Watada H. Effects of diet-induced moderate weight reduction on intrahepatic and intramyocellular triglycerides and glucose metabolism in obese subjects. *The Journal of Endocrinology & Metabolism* 2007; 92: 3326-3329.
- [71] Goodpaster BH, DeLany JP, Otto AD, Kuller L et al. Effects of diet and physical activity interventions on weight loss and cardiometabolic risk factors in severely obese adults. *JAMA* 2010; 304: 1795-1802.
- [72] Jansen I, Hudson R, Ross R. Effect of an energy restrictive diet with or without exercise on abdominal fat, intermuscular at and metabolic risk factor in obese woman. *Diabetes Care* 2002; 25:431-438.
- [73] Mazzali G, Di Francesco V, Zoico E, Fantin F, Zamboni G, Benati C, Bambara V, Negri M, Bosello O, Zamboni M. Intercorrelations between fat distribution, muscle lipid content, adipocytokines, and insulin resistance: effect of moderate weight loss in older woman. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:1193-1999.
- [74] Dagenais GR, Tancredi RG, Zierler KL. Free fatty acid oxidation by forearm muscle at rest, and evidence for an intramuscular lipid pool in the human forearm. *J Clin Invest* 1976; 58: 421-431.

- [75] Falholt K, Jensen I, Lindkaer Jensen S et al. Carbohydrate and lipid metabolism of skeletal muscle in type 2 diabetic patients. *Diabet Med* 1988; 5: 27-31.
- [76] Corcoran MP, Lamon-Fava S, Fielding RA. Skeletal muscle lipid deposition and insulin resistance: effect of dietary fatty acids and exercise. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 662-77.
- [77] Kelley DE, BS Slasky & J Janosky. Skeletal muscle density: effects of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1991; 54(3): 509-515.
- [78] Goodpaster BH, He J, Watkins S, Kelley DE. Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5755-61.
- [79] Schrauwen-Hinderling VB, Hesselink MKC, Schrauwen P, Kooi ME. Intramyocellular lipid content in human skeletal muscle. *Obesity* 2006; 14: 357-367.
- [80] Roubenoff R, Hughes VA. Sarcopenia: current concepts. *J Gerontol* 2000; 55: M716-M724 26.
- [81] Larsson L, Li X, Frontera WR. Effects of aging on shortening velocity and myosin isoform composition in single human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 1997; 272: C638-C649.
- [82] Visser M, Kritchevsky SB, Goodpasture BH et al. Leg muscle mass and composition in relation to lower extremity performance in men and women aged 70 to 79: the Health, Aging and Body Composition Study. *J Am Geriatr Soc* 2002; 50: 897-904.

- [83] Gallagher D, Kuznia P, Heshka S et al. Adipose tissue in muscle: a novel depot similar in size to visceral adipose tissue. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 903-10.
- [84] Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus: follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: 3160-3167.
- [85] Pietrobelli A, Formica C, Wang Z, Heymsfield SB. Dual-energy X-ray absorptiometry body composition model: review of physical concepts. *Am J Physiol* 1996; 271: 941-951.
- [86] Ross R, Lèger L, Morris D, deGuise J, Gardo R. Quantification of adipose tissue by MRI: relationship with antropometric variables. *J Appl Physiol* 1992; 72: 787-795.
- [87] Johnson D, Dixon A, Abrahams P. The abdominal tomographic, magnetic resonance, and anatomical observations. *Clin Anat* 1996; 9: 19-24.
- [88] Qayyum A, Goh JS, Kakar S, Yeh BM, Merriman RB, Coakley FV. Accuracy of liver fat quantification al MR imaging: comparison of out-of-phase gradient-echo fat-satured fast spin-echo techniques-iniatial experience. *Radiology* 2005; 237: 507-511.
- [89] Lee SE, Jang JY, Lim CS, Kang MJ *et al.* Measurement of Pancreatic Fat by Magnetic Resonance Imaging. *Ann Surg* 2010; 251: 932-936.
- [90] Schwenzer NF, Machann J, Martirosian P, Stefan N *et al.* Qualification of pancreatic lipomatosis and liver steatosis by MRI: compairson of in/opposed-phase and spectral-spatial exitation techniques. *Invest Radiol* 2008; 43: 330-7.

- [91] Käser L, Mannion AF, Rhyner A, Weber E, Dvorak J, Muntener M. Active therapy for chronic low back pain. Part 2. Effects on paraspinal muscle cross-sectional area, fiber type size, and distribution. *Spine* 2001;26: 909–19.
- [92] Marras WS, Jorgensen MJ, Granata KP, Wiand B. Female and male trunk geometry: size and prediction of the spine loading trunk muscles derived from MRI. *Clin Biomech* 2001;16:38–46.
- [93] Song MY, Ruts E, Kim J, Janumala I, Heymsfield S, Gallagher D. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 874-80.
- [94] Greco AV, Mingrone G, Giancaterini A et al. Insulin resistance in morbid obesity. Reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* 2002; 51: 144-151.
- [95] Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 2005. 46:2347-2355.
- [96] Murano I, Barbatelli G, Parisani V et al. Dead adipocytes, detected as crown-like structures, are prevalent in visceral depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008. 49:1562-1568.)
- [97] Istituto Nazionale della Nutrizione. Tabelle di composizione degli alimenti. (National Institute of Nutrition: tables of nutritional composition) Milano: Litho Delta, 1989.
- [98] Bonora E, Targher G, Alberiche M *et al.* Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 57-63.

- [99] Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. *J Physiol* 1949; 109:1-9.
- [100] SPSS-X User's Guide, 2nd Ed. New York: Mc Graw-Hill, 1986.
- [101] Kuk JL, Lee S, Heymsfield SB, Ross R. Waist circumference and abdominal adipose tissue distribution: influence of age and sex. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 1330-1334.
- [102] Sabir N, Sermez Y, Kazil S, et al. Correlation of abdominal fat distribution and liver steatosis: importance of ultrasonographic and anthropometric measurement. *Eur J Ultrasound* 2001; 14:121-8.
- [103] Church TS, Kuk JL, Ross R, et al. Association of cardiorespiratory fitness, body mass index, and waist circumference to non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2006;130:2023-30.
- [104] Targher G, Bertolini L, Scala L et al. Non-alcoholic hepatic steatosis and its relation to increased plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in non-diabetic men. Role of visceral adipose tissue. *Diabet Med* 2005;22: 1354-8.
- [105] Chalasani N, Deeg MA, Persohn S, et al. Metabolic and anthropometric evaluation of insulin resistance in nondiabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1849-55.
- [106] Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, et al. Abdominal fat distribution and peripheral and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:1135-43.

- [107] Monzon JR, Basile R, Henegan S et al. Lipolysis in adipocytes isolated from deep and superficial subcutaneous adipose tissue. *Obes Res* 2002; 10: 266-269.
- [108] Westerbacka J, Lammi K, Hakkinen AM, et al. Dietary fat content modifies liver fat in overweight nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2804-9.
- [109] Fraulob JC, ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A mouse model of metabolic syndrome: insulin resistance, fatty liver and non-alcoholic fatty pancreas disease (NAFPD) in C57BL/6 mice fed a high fat diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 212-223.
- [110] Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A et al. Gender difference in postprandial lipemia: importance of visceral adipose tissue accumulation. *Atheroscler Tromb Vasc Biol* 1999; 19: 2448-2455.
- [111] Pinnick KE, Collins SC, Londos C, et al. Pancreatic ectopic fat is characterized by adipocyte infiltration and altered lipid composition. *Obesity* 2008; 16:522-529.
- [112] You M, Considine RV, Leone TC, et al. Role of adiponectin in the protective action of dietary saturated fat against alcoholic fatty liver in mice. *Hepatology* 2005; 42: 568-77.
- [113] Hui JM, Hodge A, Farrel GC, et al. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alfa or adiponectin? *Hepatology* 2004; 40:46-54.
- [114] Musso G, Gambino R, Biroli G et al. Hypoadiponectinemia predicts the severity of hepatic fibrosis and pancreatic Beta-cell dysfunction in nondiabetic nonobese patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100:2438-46.

- [115] Bugianesi E, Pagotto U, Manini R et al. Plasma adiponectin in non-alcoholic fatty liver is related to hepatic insulin resistance and hepatic fat content, not to liver disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3498-504.

- [116] Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: Evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia* 2003; 46: 459-469.

- [117] Zamboni M, Armellini F, Turcato E, Todesco T, Bissoli L, Bergamo-Andreis I, Bosello O. Effect of weight loss on regional body distribution in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:29-34.

- [118] Tamura Y, Tanaka Y, Sato F, Choi, Watada H. Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* 2005; 90:3191-3196.

- [119] Larson-Meyer D, Heilbronn L, Redman L. Effect of calorie restriction with or without exercise on insulin sensitivity, beta cell function, fat cell size and ectopic lipid in overweight subjects. *Diabetes Care* 2006; 29:1137-1344.

- [120] Shah K, Stufflebam A, Hilton T, Sinacore D, Klein S, Villareal D. Diet and exercise interventions reduce intrahepatic fat content and improve insulin sensitivity in obese older adults. *Obesity* 2009; 126:1-7.

- [121] Bahl M, Qayyum A, Westphalen A, Noworolski S, Chu P, Ferrel L, Tien P, Bass N. Liver Steatosis: Investigation of opposed-phase T1-weighted liver MR signal intensity loss and visceral fat misurement as biomarkers. *Radiology* 2008; 249: 160-166.

- [122] Unger R. Reinventing type 2 diabetes. *JAMA* 2008; 299; 1185-1187.

- [123] Ryan Ryan AS, Nicklas BJ, Barman DM. Adiponectin levels do not change with moderate dietary induced weight loss and exercise in obese postmenopausal women. *International Journal of Obesity* 2003; 27:1066-1071.

- [124] Winkler G, Kiss S, Keszthelyi, Sapi Z. Expression of tumor necrosis factor in the subcutaneous and visceral adipose tissue in correlation with adipocyte cell volume, serum TNF alfa, soluble serum TNF receptor 2 concentration and C-peptide level. *European Journal of Endocrinology* 2003; 149:129-135.

- [125] Monzillo LU, Hamdy O, Horton ES. Effect of lifestyle modification on adipokine levels in obese subjects with insuline resistance. *Obesity Research* 2003; 11:1048-1054.

- [126] Koska J, Stefan N, Permana P, Weyer C, Sonoda M, Bogardus C, Smith S, Joannise D, Funahashi T, Krakoff J, Bunt J. Increased fatt accumulation in liver may link insuline resistance with subcutaneous abdominal adipocyte enlargement, visceral adiposity, and hypoadiponectinemia in obese individuals. *Am J Clin Nutr* 2008; 87:295-302.

- [127] Sijens PE, Edens MA, Bakker SJL, Stolk RP. MRI-determined fat content of human liver, pancreas and kidney. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1992-1998.

- [128] Centis E, Marzocchi R, Di Domizio S, Ciaravella MF, Marchesini G. The Effect of Lifestyle Changes in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Dig Dis* 2010;28:267–273.

TABELLA 3 Correlazioni tra infiltrazione lipidica nel fegato e nel pancreas (individuate dalle medie delle immagini di risonanza magnetica) e caratteristiche antropometriche, variabili di composizione corporea e metaboliche, abitudini alimentari (CASISTICA A).

	Contenuto lipidico del fegato	Contenuto lipidico del pancreas
Età	-0.17	0.17
Peso	0.58 ²	0.30
Indice di massa corporea	0.36 ²	0.28
Circonferenza vita	0.57 ¹	0.47 ²
TAT	0.54 ²	0.29
SCAT profondo	0.36 ³	-0.12
VAT	0.62 ¹	0.76 ¹
Log Insulina	0.51 ¹	0.18
Log Glicemia	0.03	0.22
Log indice HOMA-IR	0.49 ²	0.22
Trigliceridi	0.48 ³	0.34 ³
Log hs-PCR	0.24	0.08
Log Adiponectina	-0.49 ²	-0.39 ³
Leptina	-0.10	-0.12
Apporto grassi/die	0.34 ³	0.38 ³
Introito calorico giornaliero	0.24	0.29

Dimensione del campione, $n=38$.

TAT, tessuto adipose addominale totale; VAT, tessuto adipose viscerale; SCAT, tessuto adipose sottocutaneo; HOMA, homeostasis model assessment; hsPCR, proteina C-reattiva ad alta sensibilità;

¹ $P < 0.001$; ² $P < 0.01$; ³ $P < 0.05$.

TABELLA 4 Regressioni lineari con infiltrazione lipidica del fegato come variabile dipendente e sesso, VAT, peso, circonferenza vita e logHOMA come variabili indipendenti (CASISTICA A)

Variabili inserite nel modello	R2 totale	Coefficiente β	t	Sig.	F
1- Sesso	0.463	-.318	-2.207	.034	15.102
VAT		.461	.3.199	.003	
2- Sesso	0.483	-.264	-1.746	.090	10.598
VAT		.405	2.673	.011	
Log HOMA		.171	1.148	.259	
1- Sesso	0.377	-.289	-1.536	.133	10.607
Peso		.376	1.999	.053	
2- Sesso	0.404	-.266	-1.416	.166	7.678
Peso		.267	1.291	.205	
Log HOMA		.206	1.229	.228	
1- Sesso	0.432	-.464	-2.525	.016	13.335
Circonferenza vita		.286	2.790	.008	
2- Sesso	0.459	-.358	-1.947	.060	9.622
Circonferenza vita		.241	2.306	.027	
Log HOMA		.248	1.296	.204	

VAT, tessuto adipose viscerale; HOMA, homeostasis model assessment;

TABELLA 5 Regressioni lineari con infiltrazione lipidica del pancreas come variabile dipendente e sesso, VAT, circonferenza vita e log Adiponectina (CASISTICA A)

Variabili inserite nel modello	R2 totale	Coefficiente β	t	Sig.	F
1- Sesso	0.592	-.092	.731	.470	25.386
VAT		.812	6.467	.000	
2- Sesso	0.594	.084	.652	.519	16.609
VAT		.844	5.815	.000	
Log Adiponectina		.062	.455	.652	
1- Sesso	0.236	-.130	-.777	.443	5.405
Circonferenza vita		.411	2.455	.019	
2- Sesso	0.279	-.068	-.396	.695	4.377
Circonferenza vita		.347	2.032	.050	
Log Adiponectina		-.233	-1.418	.165	

VAT, tessuto adipose viscerale;

Tabella 6: Variabili antropometriche, di composizione corporea e distribuzione del tessuto adiposo prima e dopo calo di peso (CASISTICA C)

	Prima del calo di peso Media \pm SD N=24 (M/F:13/11)	Dopo calo di peso Media \pm SD N=24 (M/F:13/11)	Modificazioni percentuali (%)	P
Peso (Kg)	98.4 \pm 15.9	89.7 \pm 14.8	-8.74	< 0.001
BMI (Kg / peso ²)	35.4 \pm 4.5	32.2 \pm 4.0	-9.04	< 0.001
Circonferenza vita (cm)	105.4 \pm 12.3	98.6 \pm 10.6	-6.04	< 0.001
Massa grassa (Kg)	35.3 \pm 6.9	29.6 \pm 6.1	-16.1	< 0.001
Massa grassa percentuale (%)	36.4 \pm 6.2	33.5 \pm 6.4	-7.96	< 0.001
Tessuto adiposo addominale totale (TAT) (cm ²)	574.3 \pm 154.1	464.5 \pm 135.7	-19.1	< 0.001
Tessuto adiposo sottocutaneo (SCAT) (cm ²)	399.9 \pm 124.4	345.5 \pm 114.1	-13.6	< 0.001
Tessuto adiposo Viscerale (VAT) (cm ²)	174.8 \pm 94.7	118.9 \pm 76.3	-31.9	<0.001
Contenuto lipidico del fegato (%)	20.9 \pm 25.4	3.3 \pm 7.5	-84.1	<0.001
Contenuto lipidico del pancreas (%)	19.7 \pm 23.3	11.3 \pm 14.3	-42.3	=0.001

BMI = indice di massa corporea

Tabella 7: variabili metaboliche, Hs-PCR e adipocitochine, prima e dopo calo di peso (CASISTICA C)

	Prima del calo di peso Media \pm SD N=24 (M/F:13/11)	Dopo calo di peso Media \pm SD N=24 (M/F:13/11)	P
Glicemia (mmol/L)	5.1 \pm 0.6	4.9 \pm 0.6	= 0.01
Insulina (μ UI/ml)	14.9 \pm 7.8	9.1 \pm 4.3	< 0.001
HOMA	3.35 \pm 1.6	1.98 \pm 0.9	< 0.001
Colesterolo Totale (mmol/L)	5.43 \pm 1.1	4.93 \pm 0.8	= 0.002
Colesterolo HDL (mmol/L)	1.23 \pm 0.4	1.28 \pm 0.4	= 0.06
Trigliceridi (mmol/L)	1.63 \pm 0.86	1.19 \pm 0.52	= 0.01
Gamma GT (UI/L)	52.79 \pm 12.6	19.33 \pm 17.00	0.198
ALT (UI/L)	37.25 \pm 23.09	28.46 \pm 17.48	= 0.001
Leptina (ng/mL)	32.95 \pm 20.24	20.88 \pm 16.04	< 0.001
Adiponectina (μ g/ dL)	15.12 \pm 8.58	15.70 \pm 8.90	0.316
Hs-PCR (mg/L)	5.55 \pm 6.28	3.48 \pm 3.30	= 0.005

HOMA: Homeostasis Model Assessment of insulin resistance

HDL= high density lipoprotein

ALT = alanine aminotransferasi

Gamma GT = gamma glutamil transpeptidasi

Hs-PCR= Proteina C reattiva ad alta sensibilità

TABELLA 8. Correlazioni tra modificazioni variabili antropometriche, composizione corporea, variabili biochimiche e modificazioni contenuto lipidico di fegato e pancreas misurato con risonanza magnetica e indice HOMA dopo calo di peso (CASISTICA C).

	Delta contenuto lipidico fegato	Delta contenuto lipidico pancreas	Delta HOMA
Delta Peso	0.05	0.07	0.50 ³
Delta Body mass index	-0.03	-0.23	0.32
Delta circonferenza vita	0.39	0.16	0.63 ²
Delta TAT	0.63 ²	0.28	0.62 ²
Delta SCAT	0.53 ²	-0.09	0.43 ³
Delta VAT	0.66 ¹	0.55 ²	0.58 ²
Delta contenuto lipidico fegato	1	0.44 ³	0.68 ¹
Delta contenuto lipidico pancreas	0.44 ³	1	0.32
Delta Insulina	0.32	0.09	0.82 ¹
Delta Glicemia	0.03	0.22	0.13
Delta HOMA	0.68 ²	0.32	1
Delta Trigliceridi	0.10	0.03	0.16
Delta hs-PCR	0.55 ²	0.22	0.62
Delta Adiponectina	0.15	0.26	0.18
Delta Leptina	0.23	-0.12	0.05

Sample size, $n=24$.

TAT, tessuto adiposo addominale totale; VAT, tessuto adipose viscerale; SCAT, tessuto adiposo sottocutaneo; HOMA, homeostasis model assessment; hsPCR, proteina C reattiva ad alta sensibilità;

¹ $P < 0.001$; ² $P < 0.01$; ³ $P < 0.05$.

Tabella 9: Regressione Step-wise considerando le modificazioni di HOMA come variabile dipendente e le variazioni di circonferenza vita, contenuto lipidico del fegato e del pancreas e HS-PCR e sesso come variabili indipendenti (CASISTICA C).

Variabili	β Coefficiente	P	R ² Totale
1. Δ contenuto lipidico del fegato	0.68	<0.001	0.46
2. Δ contenuto lipidico del fegato	0.51	0.002	0.62
Δ circonferenza vita	0.43	0.008	
3. Δ contenuto lipidico del fegato	0.32	0.04	0.70
Δ circonferenza vita	0.42	0.005	
Δ Hs-PCR	0.34	0.031	

Hs-PCR= Proteina C reattiva ad alta sensibilità

Tabella 10: Antropometria, composizione corporea, misure RMN istologia della popolazione in studio (n =18, CASISTICA D).

Variabili	$\bar{x} \pm SD^1$	Range
Età (anni)	71.3 \pm 8.0	58-81
Altezza (cm)	168.0 \pm 9.3	149-180
Peso (kg)	78.8 \pm 7.7	67-111.2
Circonferenza vita (cm)	103.2 \pm 10.51	83.5-122
DXA:		
FM (kg) ²	27.7 \pm 7.2	18.7-40.9
FM (%) ³	32.8 \pm 7.7	24.3-45.2
LBM (kg) ⁴	54.4 \pm 4.9	36.4-80.5
ASMM (kg) ⁵	25.8 \pm 2.9	14.8-37.34
RMN :		
Area totale (TA) (mm ²) ⁶	3170.3 \pm 489.1	2104.9-4140.5
Area Muscolare (MA) (mm ²) ⁷	1888.3 \pm 470.5	1110.8-3102.5
Grasso intermuscolare (IMAT) (mm ²) ⁸ 20% (%)	1242.9 \pm 605.6	551.9-3039.7
Rapporto IMAT/TA ⁹ 20% (%)	38.2 \pm 13.9	14.0-70.30
Grasso intermuscolare (IMAT) (mm ²) ⁸ 10%	1065.1 \pm 529.5	449.6-2590.6
Rapporto IMAT/TA ⁹ 10% (%)	28.9 \pm 10.02	12.5-46.83
Istologia :		
Area occupata da adipociti /TA sezione 1 (%)	16.81 \pm 12.66	1.08-39.2
Area occupata da adipociti /TA sezione 2 (%)	16.58 \pm 9.56	2.28-33.1
Area occupata da adipociti /TA sezione 3 (%)	16.18 \pm 10.90	1.69-36.9
Area occupata da adipociti /TA media (%)	16.52 \pm 11.10	1.68-37.2

¹ media \pm standard deviation; ²FM = massa grassa (misurata con DXA); ³FM (%) = massa grassa percentuale (misurata con DXA); ⁴LBM = massa magra non ossea (misurata con DXA); ⁵ASMM = appendicular lean fat free mass (misurata con DXA); ⁶TA = total area (misurata con RMN); ⁷MA = muscle area (misurata con RMN); ⁸IMAT = intermuscular adipose tissue area (misurata con RMN); ⁹MRI IMAT/TA = IMAT/TA misurata con magnetic resonance; ¹⁰ area occupata da adipociti/TA = area occupata da adipociti rispetto ad area totale misurata con istologia;

TABELLA 2 Caratteristiche biochimiche e abitudini alimentari degli uomini e donne obesi (CASISTICA A)

Soggetti (n = 38)	$\bar{x} \pm DS$	Range	Uomini (n = 18)	$\bar{x} \pm DS$	Range	Donne (n = 20)	$\bar{x} \pm DS$	Range
Glicemia (mmol/L)	5.33 \pm 0.81	4.3-6.9		5.32 \pm 0.77	4.3-6.9		5.33 \pm 0.87	4.5-6.9
Insulina (mU/L)	16.91 \pm 14.14	3.30-85.90		22.95 \pm 17.76	7.50-85.90		11.48 \pm 6.46 ³	3.30-28.80
HOMA	4.02 \pm 3.33	0.66-19.09		5.37 \pm 4.05	1.96-19.09		2.80 \pm 1.93 ³	0.66-9.09
HsPCR (mg/L)	5.93 \pm 5.48	0.66-32.40		6.13 \pm 7.01	0.91-32.40		5.75 \pm 3.81	0.66-16.70
ALT (U/L)	37.68 \pm 19.97	9-97		47.28 \pm 18.70	26-97		29.05 \pm 17.26 ²	9-80
Leptina (ng/mL)	35.19 \pm 22.81	8.60-78.00		25.79 \pm 18.63	8.60-78.01		47.72 \pm 22.46 ²	17.00-77.80
Adiponectina (ug/mL)	10.72 \pm 6.03	2.70-25.20		7.86 \pm 3.74	2.70-17.20		13.28 \pm 6.61 ²	4.15-25.20
Introito calorico giornaliero (Kcal/die)	2510.39 \pm 629.63	1501-4223		2745.22 \pm 697.66	1501-4223		2299.05 \pm 487.09 ³	1668-3135
Apporto grassi/die (gr)	90.82 \pm 33.12	39-217		100.89 \pm 39.05	49.7-217.0		81.77 \pm 24.28	39-126.0

HOMA, homeostasis model assessment; hsPCR, proteina C-reattiva ad alta sensibilità; ALT, alanina aminotransferasi; Differenza significativa rispetto agli uomini (t test le medie): ¹P < 0.001; ²P < 0.01; ³P < 0.05.

TABELLA 1 Caratteristiche antropometriche, variabili RMN della popolazione in studio e confronto con gruppo di controllo dei soggetti magri (CASISTICA A e B)

	Soggetti magri (n=12)		Soggetti obesi (n = 38)		Uomini obesi (n = 18)		Donne obese (n = 20)	
	$\bar{x} \pm DS$	Range	$\bar{x} \pm DS$	Range	$\bar{x} \pm DS$	Range	$\bar{x} \pm DS$	Range
Età (anni)	47.25 ± 14.88	28-66	49.13 ± 13.00	25-72	45.83 ± 13.40	26-69	52.10 ± 12.21	25-72
Peso (kg)	66.50 ± 11.19	44-83.1	95.30 ± 16.17 ¹	65.0-123.6	107.15 ± 9.29	89.6-123.6	84.63 ± 13.39 ⁴	65.0-118.5
BMI (kg/m ²)	22.85 ± 2.11	17.60-24.82	34.96 ± 4.21 ¹	30.07-50.00	35.35 ± 3.25	30.07-40.87	34.60 ± 4.97	30.30-50.00
Circonferenza vita (cm)	87.21 ± 7.10	75- 98.5	106.42 ± 11.07 ¹	85.00-126.00	111.83 ± 6.91	102.00-124.00	101.55 ±11.96 ⁵	85.00-126.00
TAT (cm ²)	223.21 ± 65.78	144.11-351.57	593.86 ± 141.61 ¹	358.41-1027.06	611.11 ± 126.90	406.30-815.13	578.34 ± 155.26	358.40-1027.06
SCAT (cm ²)	159.42 ± 55.8	102.88-253.70	413.05 ± 117.32 ¹	203.40-657.60	376.12 ± 114.07	204.20-559.03	456.44 ± 131.40	276.30-766.50
SCAT profondo (cm ²)	82.23 ± 37.35	46.80-150.18	252.07 ± 82.28 ¹	83.60-469.12	265.32 ± 88.37	122.55-469.12	240.29 ± 90.83	122.7-373.78
VAT (cm ²)	63.87 ± 31.62	22.10-124.69	180.81 ± 101.95 ¹	53.68-406.10	234.99 ± 98.46	87.78-406.10	132.06 ± 79.27 ⁵	53.7-369.46
Contenuto lipidico del fegato	0.01 ± 0.03	0.000-0.761	0.24 ± 0.22 ¹	0.002-0.931	0.36 ± 0.24	0.003-0.931	0.12 ± 0.12 ⁴	0.002-0.370
Contenuto lipidico del pancreas	0.04 ± 0.06	0.000-0.090	0.19 ± 0.20 ³	0.001-0.761	0.26 ± 0.25	0.001-0.761	0.13 ± 0.12 ⁶	0.001-0.480

Differenze significative rispetto ai soggetti magri (t test per le medie):¹*P* < 0.001; ²*P* < 0.01; ³*P* < 0.05 Differenze significative rispetto agli uomini (t test per le medie): ⁴*P* < 0.001; ⁵*P* < 0.01; ⁶*P* < 0.05.

TAT,tessuto adipose addominale totale; VAT,tessuto adipose viscerale; SCAT,tessuto adiposo sottocutaneo.

Figura 1 Riproducibilità della quantificazione del contenuto lipidico del pancreas con tecnica chemical shift

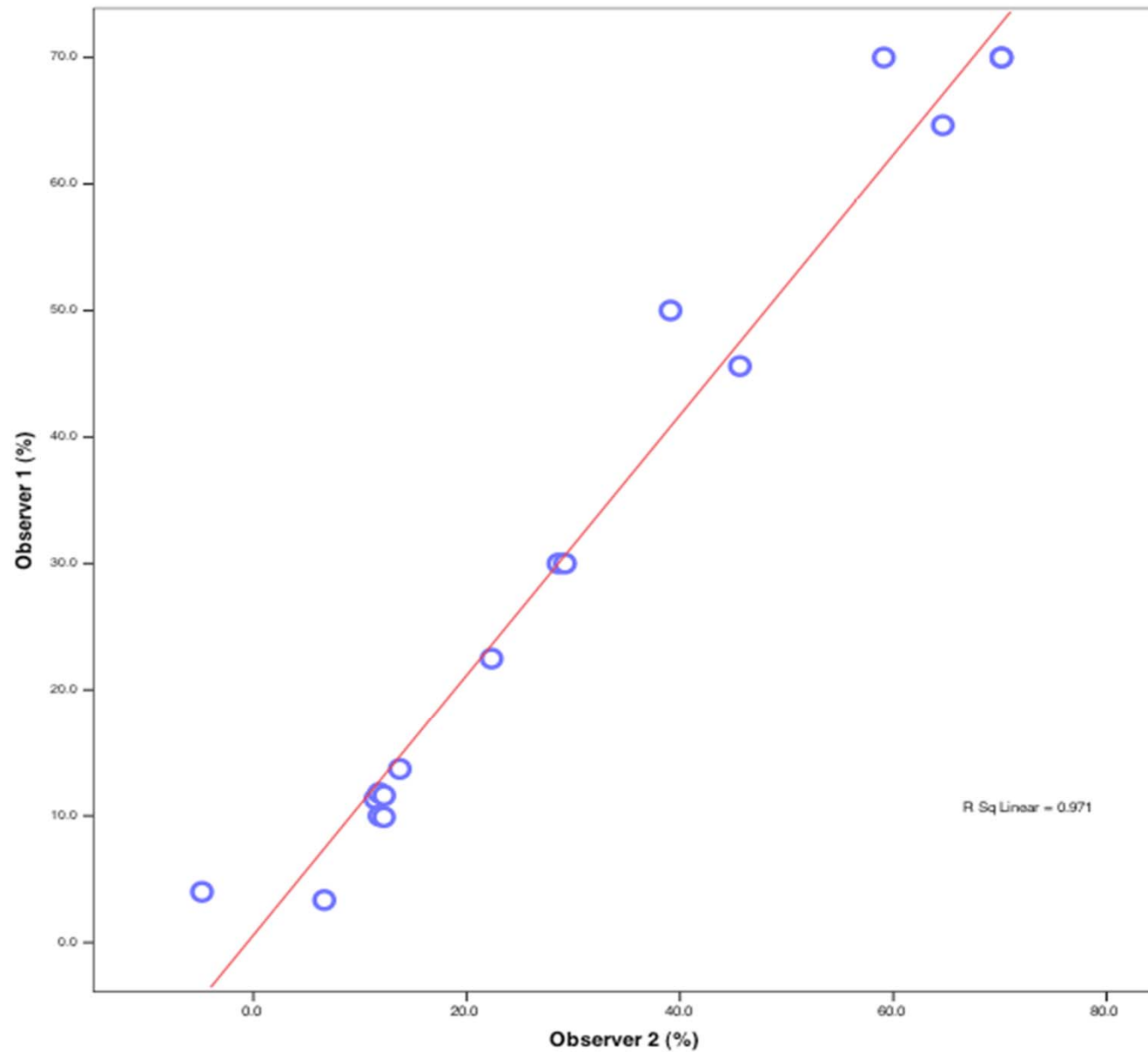


Figura 2

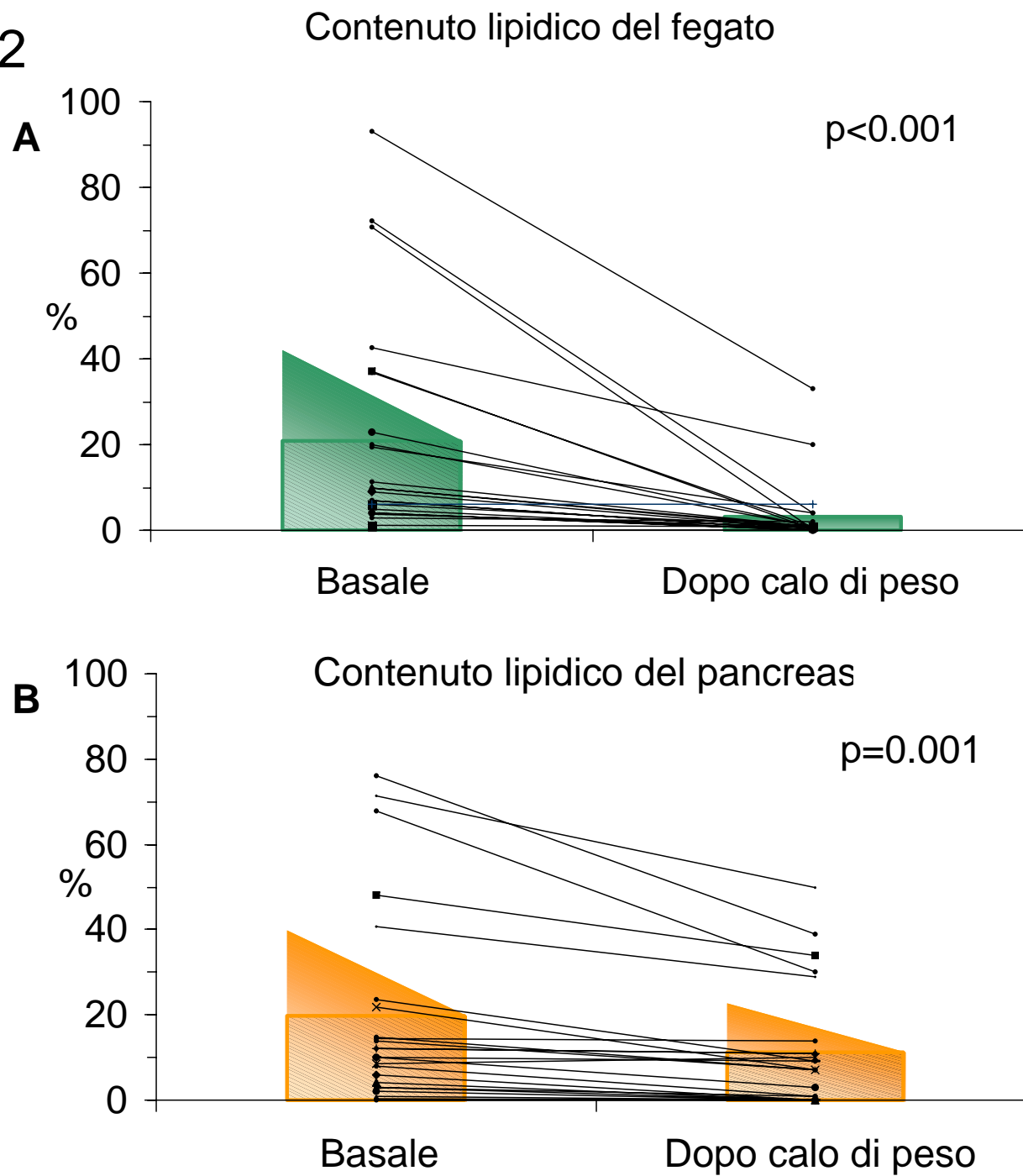


Figura 3

Prevalenza di steatosi epatica prima e dopo calo di peso

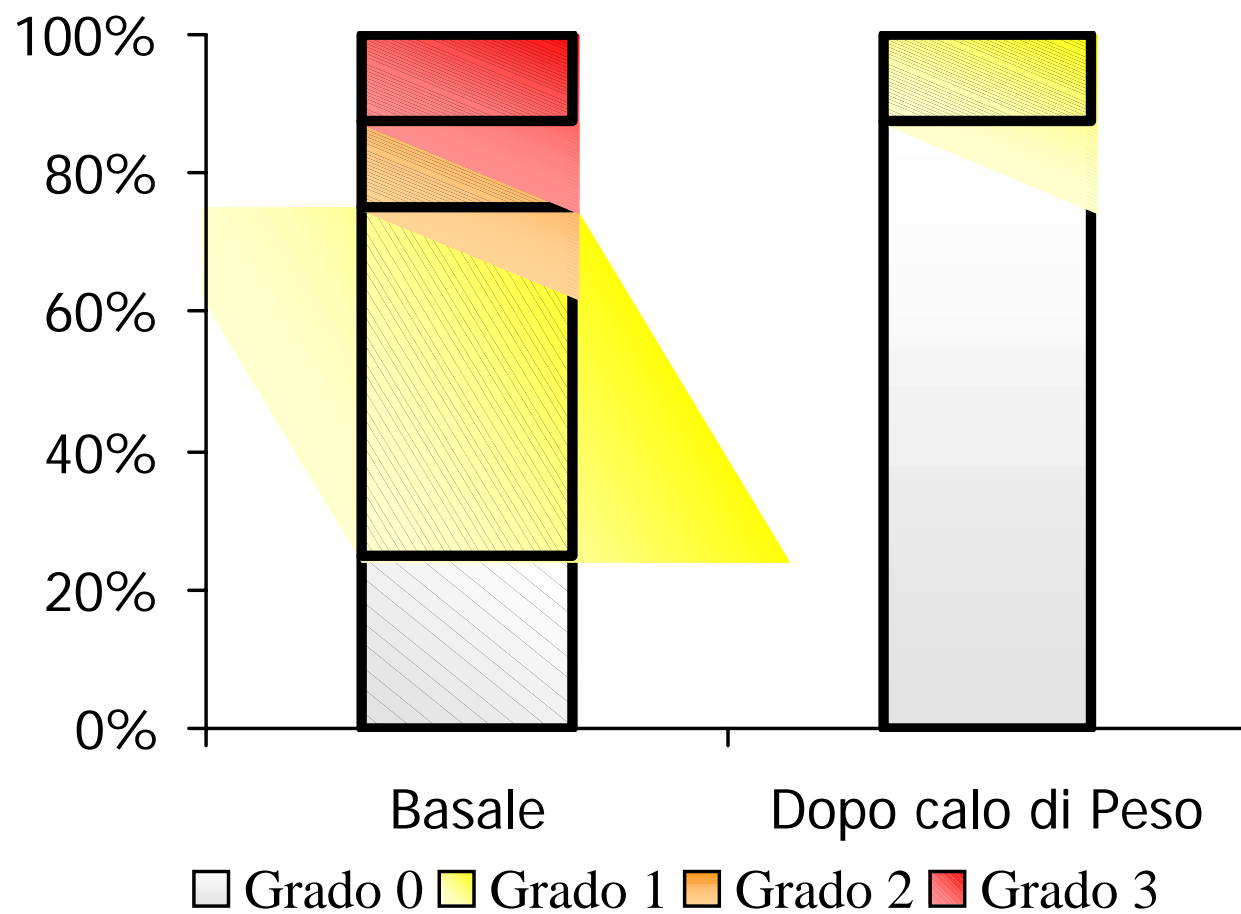


Figura 4

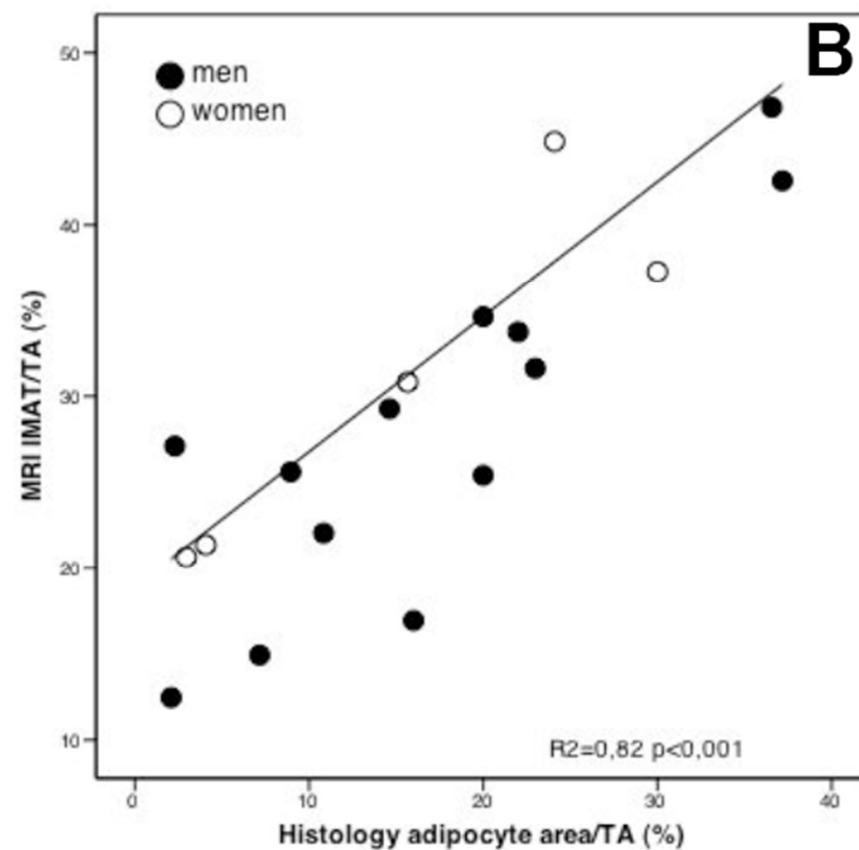
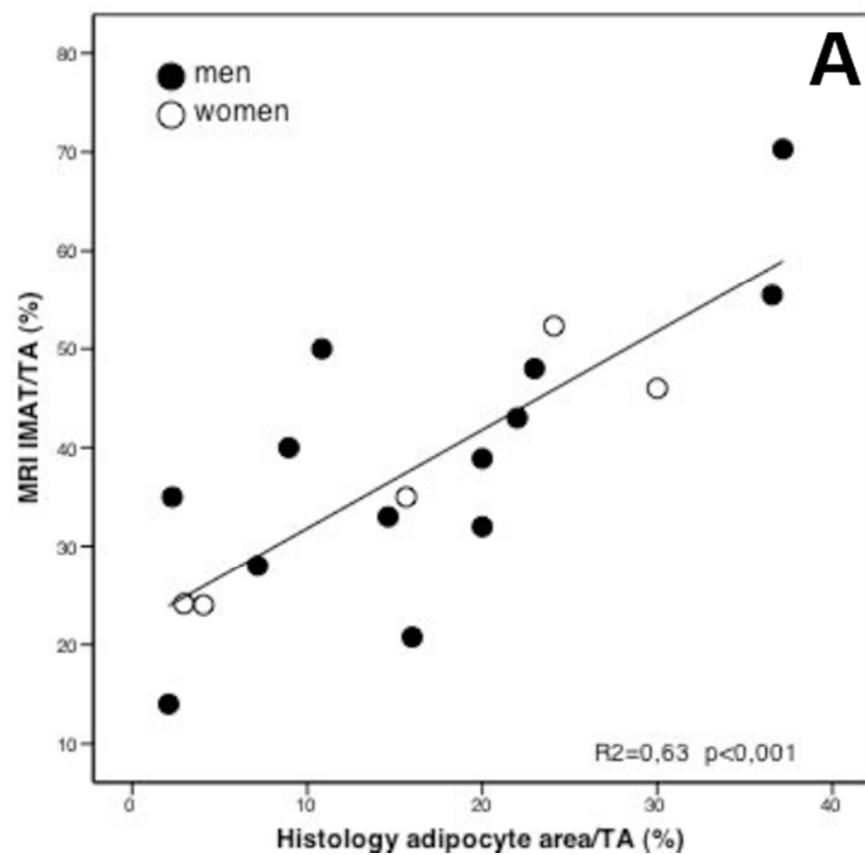


Figura 5

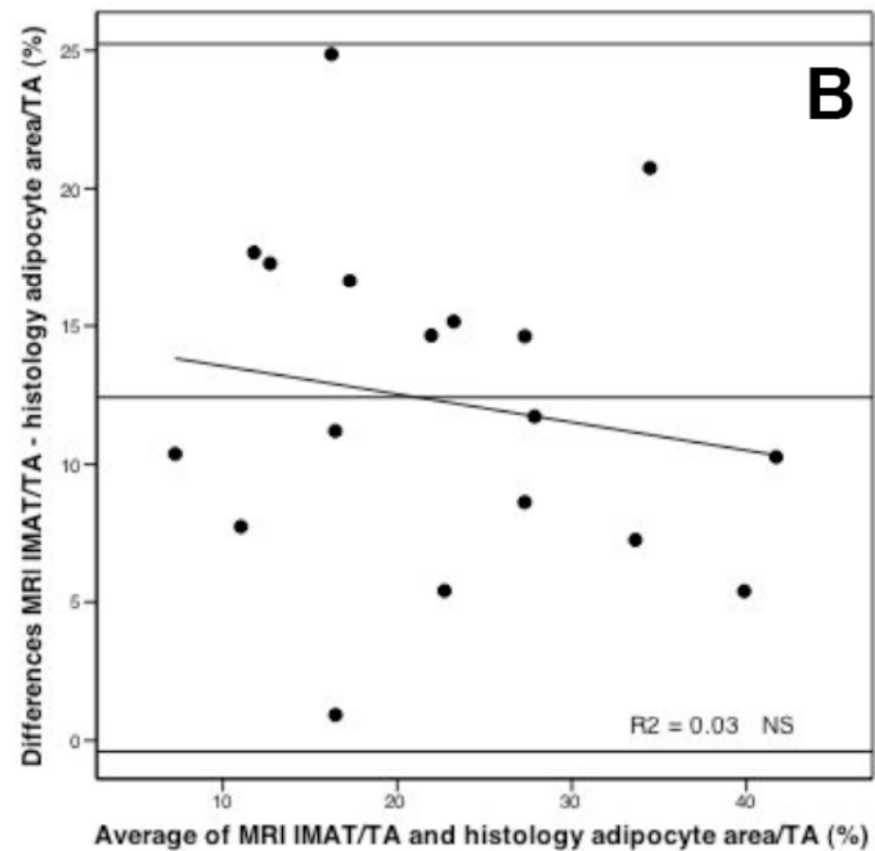
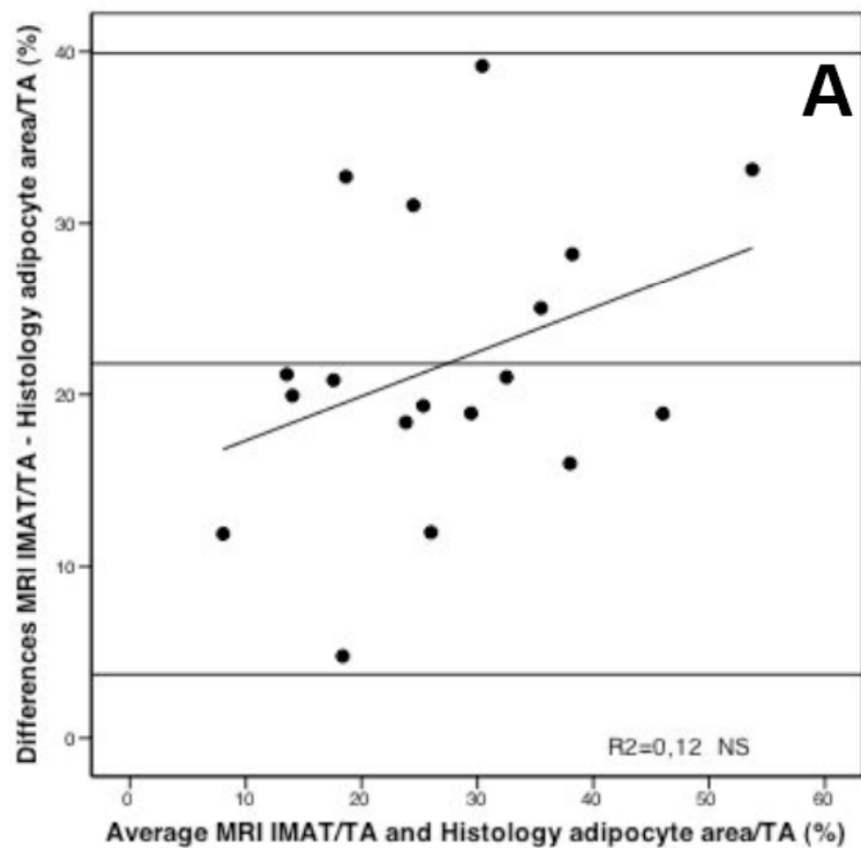
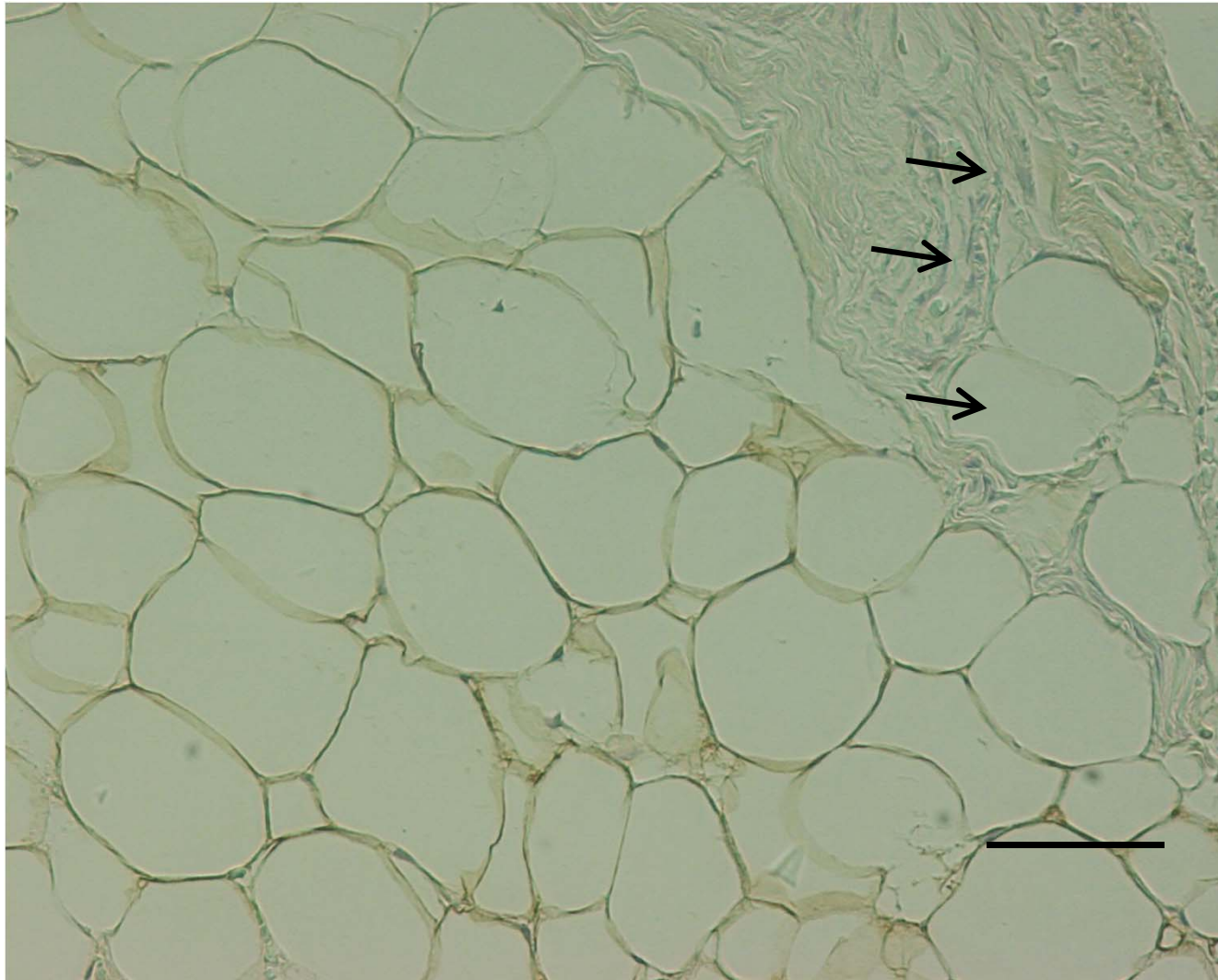


Figura 6



Tessuto adiposo Intermuscolare (paravertebrale). Adipocites immunoreactive alla perilipina (metodo ¹IHC, ²ABC). Fibrosis area containing perilipin negative lipid droplets (frece nere) è visibile nel lato destro dell'immagine.

Bar = 50 μ m. ¹IHC = Immunoistochimica; ²ABC = Avidin - Biotin Peroxidase Complex method.